

ULOGA OKOLIŠNIH MIKROORGANIZAMA U BIORAZGRADNJI KSENOBIOTIKA

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac
Sveučilište u Zagrebu,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, Zagreb, Hrvatska
mvukovic@fkit.unizg.hr

Katarina Muzica

Sveučilište u Zagrebu,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, Zagreb, Hrvatska

Ana Čurić

Sveučilište u Zagrebu,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, Zagreb, Hrvatska

Ana Šket

Sveučilište u Zagrebu,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, Zagreb, Hrvatska

dr. sc. Monika Šabić Runjavec

Sveučilište u Zagrebu,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, Zagreb, Hrvatska

Kao posljedica ubrzane industrijalizacije, modernizacije i porasta broja svjetskog stanovništva, dolazi do povećane emisije ksenobiotika u sve sastavnice okoliša. Ksenobiotici čine mnogobrojnu i raznoliku skupinu kemijskih tvari koje su odgovorne za opsežna onečišćenja okoliša uzrokujući promjene u ekosustavima. Zbog postojanosti i otpornosti u okolišu postoji velika potreba za razgradnjom ovih ksenobiotičkih spojeva na ekološki prihvatljiv način. Mikrobnе zajednice imaju sposobnost razgradnje širokog raspona spojeva zbog čega je njihova uloga značajna za funkcioniranje ekosustava. Zahvaljujući velikom metaboličkom potencijalu, mikroorganizmi se mogu prilagoditi novim supstratima, pri čemu proizvode enzime odgovorne za razgradnju što može biti učinkovito sredstvo za detoksikaciju okoliša. Temeljitiје poznavanje mikroorganizama i bolje razumijevanje metaboličkih puteva pri uklanjanju ksenobiotika omogućit će svrhovitu primjenu biorazgradnje.

Ključne riječi: biorazgradnja, ksenobiotici, okolišni mikroorganizmi, onečišćenje okoliša

1. UVOD

Posljednjih godina svjedoci smo sve veće masovne proizvodnje, urbanizacije i porasta broja svjetskog stanovništva. Zbog neselektivnog i učestalog ispuštanja ksenobiotika različitim antropogenim aktivnostima dolazi do porasta koncentracije onečišćujućih tvari u okolišu (Smitha i sur., 2017.). Ksenobiotike možemo definirati kao antropogene spojeve koji se nalaze u živim sustavima ili u okolišu, a nisu ondje prirodno prisutni (Varsha i sur., 2011.; Qadir i sur., 2017.; Singh 2017.; Mishra i sur., 2021.; Subbulakshmi i sur., 2021.). Iako nam brojni sintetski spojevi uvelike olakšavaju svakodnevni život, postaje sve jasnije da ujedno predstavljaju i ozbiljnu dugoročnu ugrozu za cjelokupni ekosustav. Gotovo svaka antropogena aktivnost rezultira slučajnom ili namjernom emisijom određene količine takvih spojeva u okoliš. Otpadni tokovi kemijske, farmaceutske, tekstilne i mnogih drugih industrija kao i otpad iz kućanstava, bogati su ksenobiotičima koji uključuju pesticide, policikličke aromatske ugljikovodike (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs), farmaceutske aktivne spojeve

(*pharmaceutical active compounds*, PhACs), proizvode za osobnu njegu (*personal care products*, PCPs), fenole, klorirane spojeve i ostale industrijske kemijske spojeve (Qadir i sur., 2017.; Mishra i sur., 2021.). Na taj način ove onečišćujuće, a nerijetko i toksične tvari, bivaju raspršene kroz atmosferu, hidrosferu i litosferu te podliježu transformacijama u druge spojeve koji mogu biti još štetniji za floru i faunu te čovjeka (Singh 2017.).

Jedan od procesa kojim se mogu ukloniti okolišna onečišćenja je biorazgradnja (Caracciolo i sur., 2014.). Proces biorazgradnje se odvija pomoću autohtonih i egzogenih mikroorganizama, odnosno njihovih enzima, koji su ključni u procesima transformacije, mineralizacije, akumulacije te općenito uklanjanja onečišćujućih tvari iz okoliša (Qadir i sur., 2017.; Singh 2017.; Mishra i sur., 2021.). Najveća prednost korištenja mikroorganizama za biorazgradnju ksenobiotika je izostanak stvaranja štetnih spojeva, a krajnji su produkti nerijetko voda i ugljikov dioksid (Varsha i sur., 2011.). Potencijalna prepreka može biti što aktivnost mikroorganizama ovisi o okolišnim uvjetima što je zanemarivo ukoliko se koriste prirodno

prisutne kulture prilagođene na nastalo onečišćenje. Takvi autohtoni mikroorganizmi su vrlo učinkoviti s obzirom da su već stekli određenu otpornost na povišene koncentracije ksenobiotika, kao i na uvjete koji u takvim okolišima često mogu biti ekstremni, stoga njihov rast i aktivnost neće biti inhibirani (Singh 2017.).

2. BIORAZGRADNJA

Ksenobiotici predstavljaju problem zbog svoje kompleksne strukture i postojanosti. Ovakva svojstva ih čine idealnima za bioakumulaciju u okolišu u kojem mogu štetno djelovati na različite organizme koji tamo obitavaju (Mishra i sur., 2021.). Mikroorganizmi, koji se mogu pronaći u svim sastavnicama okoliša, imaju svojstvo kataboliziranja raznih vrsta spojeva i pritom ih koriste kao izvor energije i ugljika. Takav proces naziva se biorazgradnja i prepoznat je kao moguće rješenje za probleme koje stvaraju ksenobiotici i kao zamjena za dosadašnje fizikalno-kemijske postupke (Singh 2017.). Fizikalno-kemijski postupci su skupi te se često stvaraju nepoželjni produkti koji mogu biti toksičniji od prvobitnih ksenobiotika koji se uklanjaju te zahtijevaju dodatno zbrinjavanje (Varsha i sur., 2011.).

Biorazgradnja je prirodan biološki proces razgradnje kompleksnih spojeva pomoću mikroorganizama, odnosno njihove enzimске aktivnosti. Kako bi proces biorazgradnje bio ostvariv, najprije su potrebni mikroorganizmi koji su sposobni proizvesti potrebne enzime (Caracciolo i sur., 2014.; Balabanova 2017.; Subbulakshmi i sur., 2021.). Na biorazgradnju može utjecati i prisutnost više različitih mikrobioloških kultura koje su u međusobnoj kompeticiji kako bi koristili ksenobiotik kao hranjivu tvar. To nerijetko može negativno utjecati na biorazgradnju ksenobiotika (Goyal i Basniwal 2017.). Za uspješan proces biorazgradnje bitni su povoljni okolišni uvjeti u kojima će mikroorganizmi rasti te sama biorazgradnja se može provoditi na dva načina. Kod prvog načina, mikroorganizmi ksenobiotike koriste kao jedini izvor energije i ugljika, probavljaju ih odnosno razgrađuju te rastu i razmnožavaju se. Drugi način je kometabolizam. To je proces koji se odvija kada se mikroorganizmi hrane nekim drugim supstratom uz ksenobiotik koji je potrebno razgraditi. U tome slučaju dolazi do transformacije ksenobiotika u manje kompleksne i manje štetne tvari pomoću enzima koje mikroorganizmi izlučuju tijekom metabolizma nekim drugim supstratom, a ne ksenobiotikom. Kometabolizam se još može opisati kao transformacija supstrata odnosno ksenobiotika koji se ne koristi za rast uz obaveznu prisutnost drugog supstrata koji se koristi za rast mikroorganizama (Dalton i sur. 1982.; Caracciolo i sur., 2014.; Mishra i sur., 2021.).

Biorazgradnja uključuje raspad kompleksnih organskih spojeva putem biotransformacije ili putem mineralizacije. Biotransformacija podrazumijeva raspad ksenobiotika na manje kompleksne metabolite pri čemu ne dolazi do potpune transformacije u anorganske spojeve (Sing i Ward 2004.). Ovaj mehanizam su razvili mikrobi kako

bi se prilagodili promjenama u okolišu za rješavanje ekoloških problema poput razgradnje ksenobiotika (Smitha i sur., 2017.). Mineralizacija je proces u kojemu se aerobnim ili anaerobnim putem biorazgradivi materijali u potpunosti pretvaraju u anorganske spojeve. Proces mineralizacije je završen kada se sva biomasa potroši i pretvori u anorganske produkte, odnosno kada se sav organski ugljik pretvori u anorganski ugljik (CO₂). Hoće li se biorazgradnja odvijati aerobno ili anaerobno ovisi o prisutnosti kisika u onečišćenom području ili reaktoru kao i o vrsti mikroorganizama koji se tamo nalaze i njihovoj potrebi za kisikom (Kumar i sur., 2017.).

2.1. Biomagnifikacija i biorazgradnja

Već je spomenuto da su ksenobiotici iznimno otporni i postojani spojevi u okolišu zbog čega se u njemu bioakumuliraju te dolazi do ulaska ksenobiotika u hranidbeni lanac. Ksenobiotici predstavljaju problem za svaku razinu hranidbenog lanca i potrebno je naći način na koji će ih se sigurno moći ukloniti iz okoliša (Goyal i Basniwal 2017.).

Za učinkovit proces biorazgradnje, kako u okolišu tako i u laboratorijskim uvjetima, ksenobiotik mora biti biorazgradljiv razgrađivačima, odnosno mikroorganizmima. Biorazgradljivost je količina nutrijenata, odnosno organske tvari, dostupna organizmu za metaboliziranje, adsorpciju i razgradnju (Balabanova 2017.; Goyal i Basniwal 2017.). Brzina biorazgradnje ovisi o brzini kojom mikroorganizmi metaboliziraju onečišćujuću tvar i koliko se ona brzo prenosi kroz njihovu masu, a to nadalje ovisi o biorazgradljivosti (Sing 2004.). Biorazgradljivost ksenobiotika ovisi o njihovom poluživotu (vremenu potrebnom da se količina ksenobiotika smanji za pola), topljivosti u vodi, strukturi, koncentraciji i fizikalno-kemijskim okolišnim uvjetima. Dulji poluživot ksenobiotika smanjuje njegovu biorazgradljivost. Tijekom dužeg zadržavanja u tlu, ksenobiotik ulazi u mikropore tla gdje zaostaje i više nije biorazgradljiv. Na taj način mikrobne zajednice nisu u mogućnosti koristiti ksenobiotik kao izvor hrane i energije te ga nisu u mogućnosti biorazgraditi. Kada govorimo o topljivosti, oni ksenobiotici koji su lako topljivi u vodi lakše su podložni biorazgradnji nego oni teže topljivi, jer imaju veću biorazgradljivost. Koncentracija ima veliku ulogu u biorazgradnji raznih onečišćujućih tvari. Niske koncentracije ksenobiotika neće izazvati produkciju enzima kod mikroorganizama koji su odgovorni za biorazgradnju. S druge strane, visoke koncentracije ksenobiotika mogu biti toksične za mikrobiološke zajednice, što neizbježno rezultira smanjenom biorazgradnjom. Drugi okolišni uvjeti koji imaju utjecaj na biorazgradljivost i biorazgradnju su salinitet, pH, temperatura, dostupnost nutrijenata i vode te električna provodnost (Goyal i Basniwal 2017.).

2.2. Uloga mikroorganizama u biorazgradnji

Mikroorganizmi imaju važnu ulogu u gotovo svakom prirodnom ciklusu. Pronađeni su u svim sastavnicama okoliša, od vodenih do kopnenih, u zraku, unutar ljudskog

tijela pa čak i u ekstremnim okruženjima kao što su hidrotermalni izvori i vulkani. U svakodnevnom životu, njihova je prisutnost ključna u različitim procesima poput fermentacije šećera u alkohol, proizvodnje antibiotika i inzulina, te biorazgradnje različitih tvari. Glavne skupine mikroorganizama su bakterije, praživotinje, gljive (kvasci i plijesni), mikroskopske alge, cijanobakterije i virusi (Pelczar i Pelczar 2022.). Kao što je već navedeno, mikroorganizmi provode procese biorazgradnje koji mogu biti aerobni i anaerobni. Aerobni procesi zahtijevaju kontinuiranu opskrbu kisikom, dok se anaerobni procesi provode u anaerobnim uvjetima bez prisustva kisika u staništima kao što su podzemne vode, sedimenti, odlagališta otpada i slično. Korištenje mikroorganizama za procese biorazgradnje je vrlo učinkovito zbog velikog kataboličkog potencijala kao i sadržaja različitih enzima, gena i metaboličkih puteva za razgradnju onečišćujućih tvari u okolišu. Osim cijelih stanica, moguće je koristiti i odgovarajuće enzime izolirane iz okolišnih mikroorganizama koji mogu poslužiti kao biokatalizatori za veliki broj reakcija. Mikroorganizmi koji obitavaju na području onečišćenja, odnosno autohtoni mikroorganizmi, pokazuju visoku otpornost na nepovoljne uvjete i sposobnost biorazgradnje onečišćenja, upravo zbog njihove prilagodbe na prisutne uvjete (Singh 2017.).

Među najvažnijim mikroorganizmima u procesu biorazgradnje pokazale su se bakterije. To su prokarioti, jednostanični organizmi čiji DNK (deoksiribonukleinska kiselina) materijal nije sadržan u jezgri već presavijen u nit bez određenog mjesta unutar stanice. Bakterijske stanice mogu biti različitih oblika kao što su koki, štapići i spirale, a veličina stanica varira između 0,5 do 5 μm . Osim pojedinačnih stanica, mogu se pojavljivati u parovima, lancima, tetradama ili klasterima. Prema Gramu dijele se u dvije osnovne skupine: gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Ova podjela se isključivo bazira na građi stanične stijenke bakterije (Pelczar i Pelczar 2022.). Uspješnu razgradnju ksenobiotika među istraživanim bakterijama pokazale su bakterije iz roda *Pseudomonas* i *Bacillus* (Mishra i sur., 2021.; Sodhi i sur., 2021.).

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je heterotrofna, pokretna, gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija štapićastog oblika, duga od 1 do 5 μm i široka od 0,5 do 1,0 μm . Pripada obitelji *Pseudomonadaceae* koju karakterizira preživljavanje u širokom rasponu uvjeta u okolišu. Raste pri temperaturi od 37 °C, ali može preživjeti pri temperaturama od 4 do 42 °C. Vrlo je značajna bakterija u tlu zbog svoje sposobnosti biorazgradnje ksenobiotika kao što su policiklički aromatski ugljikovodici (Diggle i Whiteley 2020.). *P. aeruginosa* sadrži relativno velik genom u usporedbi s drugim bakterijama, a sam genom sadrži veliki udio regulatornih enzima koji su izuzetno važni za metabolizam i dobru prilagodbu u okolišu. Stoga ova bakterija pokazuje otpornost na razne antibiotike, uključujući aminoglikozide, kinolone i β -laktame. Glavni mehanizam kojim se koristi za suzbijanje antibiotika je

upravo njezina stečena i prilagodljiva otpornost koja uključuje stvaranje biofilma. Biofilm djeluje kao difuzijska barijera za ograničavanje prodiranja antibiotika do bakterijske stanice (Pang i sur., 2019.).

2.2.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je heterotrofna, brzorastuća, pokretna, gram-pozitivna, aerobna bakterija štapićastog oblika. Duga je od 2 do 6 μm i široka obično manje od 1 μm . Pripada obitelji *Bacillaceae*. Raste pri temperaturama od 30 do 35 °C, što predstavlja optimalan raspon temperatura pri kojima dolazi do udvostručenja stanica u samo 20 minuta. Karakteristično je da u određenim uvjetima stanice imaju tendenciju formiranja dugih lanaca. Kada je stanica u nepovoljnim uvjetima dolazi do nastanka endospora, dok vegetativne stanice stvaraju biofilm (Errington i Aart 2020.). Karakterizira je izuzetna genetska stabilnost te je ova vrsta općenito priznata kao sigurna vrsta za korištenje u različitim procesima. Izvršne fiziološke karakteristike i prilagodljiv metabolizam čine je jednostavnom i jeftinom za uzgoj. Primjerice, ciklus fermentacije je kraći i iznosi 48 sati u usporedbi s ciklusom fermentacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji traje čak 180 sati (Su i sur., 2020.). *B. subtilis* je vrlo važna industrijska bakterija zbog izlučivanja važnih hidrolitičkih enzima te zbog proizvodnje riboflavina, antibiotika, vitamina i aminokiselina (Errington i Aart 2020.; Shah i Shah, 2020.). Navedeni spojevi imaju veliku ulogu u raznim područjima primjene kao što su prehrambena, kozmetička i farmaceutska industrija. Prema nepotpunoj statistici, enzimi proizvedeni pomoću *B. subtilis* čine 50 % ukupnog tržišta enzima (Su i sur., 2020.).

3. KSENOBIOTICI

Pojam ksenobiotika označava antropogene spojeve koji se mogu pronaći u živim organizmima ili u okolišu, a ondje nisu dospjeli prirodnim putem. Razlog njihove opasnosti po zdravlje ljudi, ali i stanje cjelokupnog ekosustava je postojanost u okolišu te toksična svojstva pojedinih spojeva (Varsha i sur., 2011; Singh 2017.; Subbulakshmi i sur.; 2021.). Ovakve molekule karakterizira iznimna stabilnost zahvaljujući jakim kemijskim vezama i supstituentima u njihovoj strukturi koji onemogućavaju razgradnju tih spojeva pomoću većine mikrobioloških enzima. Tome pridonosi i svojstvo hidrofobnosti koje posjeduje većina ksenobiotika, a omogućava im imobilizaciju na krutim česticama nakon ispuštanja u okoliš. U skladu s razvojem industrije i poboljšanjem kvalitete života u razvijenim zemljama, pojavljuje se puno novih, neistraženih spojeva, što otežava njihovo uklanjanje iz okoliša (Singh 2017.; Subbulakshmi i sur.; 2021.). Anorganske i organske onečišćujuće tvari mogu biti podložne transformaciji u druge spojeve, stoga je teško predvidjeti konačne produkte i njihov utjecaj na različite sastavnice okoliša (Singh 2017.).

Brojni su putevi dospijevanja ksenobiotika u okoliš. Izvori ovih spojeva najčešće se dijele na izravne i neizravne, ovisno o načinu na koji ksenobiotici dolaze

u kontakt s okolišem. Neki od značajnijih primarnih izvora obuhvaćaju emisije otpadne vode i krutog otpada iz industrijskih postrojenja, primjerice farmaceutske, kemijske, tekstilne, papirne i ostalih industrija u kojima se koriste razni kemijski spojevi. Otpadni tokovi najčešće sadržavaju cijelu lepezu različitih spojeva (Varsha i sur., 2011.; Mishra i sur., 2021.). Proizvodnja papira je glavni izvor kloriranih organskih spojeva u okolišu. Procesom rudarenja oslobađaju se značajne količine teških metala, a isto tako potencijalni rizik od onečišćenja i ekoloških katastrofa donose radnje povezane s preradom i distribucijom fosilnih goriva u čijem sastavu se nalaze spojevi koji se mogu svrstati u skupinu ksenobiotika. Poljoprivredna djelatnost je također odgovorna za određenu količinu ksenobiotika u okolišu zbog masovne upotrebe umjetnih gnojiva i pesticida. Neizravni izvori pak uključuju farmaceutske spojeve, lijekove, ostatke pesticida i slične tvari koje indirektno nakon korištenja dospijevaju u okoliš i žive organizme (Varsha i sur., 2011.; Singh 2017.).

Primjer iznimno stabilnih ksenobiotika jesu poliaromatski, dušikovi i halogeni organski spojevi, koji su upravo zbog svoje stabilnosti teže podložni biorazgradnji. Takvi spojevi imaju veći potencijal za bioakumulaciju i biomagnifikaciju u biološkim sustavima. Osim toga, ukoliko spoj ne podliježe procesima transformacije, odnosno ne reagira s drugim spojevima, najčešće se akumulira u tlu, površinskim i podzemnim vodama te sedimentima gdje ostaje duži vremenski period (Singh 2017.; Subbulakshmi i sur.; 2021.).

Brzina povećanja proizvodnje antropogenih spojeva nije u skladu s trenutno dostupnim tehnologijama obrade otpadnih tokova tih procesa što predstavlja problem koji zahtjeva hitno rješavanje. Primjerice, svjetska proizvodnja fenola prešla je brojku od osam milijuna tona godišnje već 2008. godine. Zbog neadekvatnih tehnologija obrade i uklanjanja takvih spojeva, dolazi do njihove akumulacije u ekosustavima, a dugoročno gledano posljedice mogu biti pogubne ukoliko se ne poduzmu odgovarajući koraci. Posebno zabrinjava prisutnost ksenobiotika u otpadnim, a posljedično i u površinskim i podzemnim vodama koje su izvori pitke vode (Shah i Shah 2020.; Chaturvedi i sur., 2021.). Iako ksenobiotici ne moraju nužno biti toksični, većina spojeva izaziva akutne karcinogene, mutagene i teratogene učinke na ljudima. Zbog svega navedenog, jasno je da je nužna potreba za učinkovitim postupcima uklanjanja ili razgradnje takvih spojeva kako bi se spriječili ti neželjeni učinci (Subbulakshmi i sur.; 2021.).

3.1. Farmaceutici

U svijetu se svakodnevno koristi preko četiri tisuće različitih farmaceutskih spojeva. Jedan dio tih spojeva čine i antibiotici koji se između ostalog koriste za zaštitu ljudi od mikrobioloških infektivnih bolesti. Antibiotici su neophodni za održavanje zdravlja i kvalitete življenja čovječanstva. Unatoč tome, sve češće se govori o detekciji ovih spojeva u vodenim i kopnenim sustavima što uzrokuje popriličnu zabrinutost znanstvenika (Caracciolo

i sur., 2014.; Chaturvedi i sur., 2021.; Zhu i sur., 2021.), a što je posljedica sve veće potrošnje raznih farmaceutskih pripravaka koji su nakon korištenja izlučeni iz organizma te završavaju u otpadnim vodama (Al-Ahmad i sur., 1999.; Yasodara Liyanage i Manage 2016; Yang C.-W. i sur., 2020.). Procjenjuje se da će se globalna potrošnja antibiotika povećati za 67 % do 2030. godine. Dokazano je da se samo mali dio antibiotika metabolizira ili apsorbira u ljudskom ili životinjskom organizmu, dok ostatak dospijeva do vodenih sustava ili tla nepromijenjen ili u obliku primarnih metabolita (Zhu i sur., 2021.). Ukoliko se oni ne uklone u potpunosti u postrojenjima za obradu otpadnih voda, što je nažalost najčešći slučaj, vrlo lako dospijevaju do ostalih sastavnica okoliša (Caracciolo i sur., 2014.; Al-Gheethi i sur., 2016; Shah i Shah 2020.).

Farmaceutici se razlikuju od ostalih onečišćujućih tvari jer su dizajnirani da budu bioaktivni već pri nižim koncentracijama. Zbog toga već i iznimno male koncentracije prisutne u okolišu predstavljaju opravdan razlog za zabrinutost. Koncentracija različitih antibiotika varira s obzirom na komponentu okoliša koja se analizira (Caracciolo i sur., 2014.; Yasodara Liyanage i Manage 2016.). Njihova prisutnost detektirana je u otpadnim vodama, slatkoj vodi, morskoj vodi te u sedimentu. U postrojenjima za obradu otpadnih voda, njihova koncentracija može doseći i red veličine $\mu\text{g L}^{-1}$ (Chaturvedi i sur., 2021.; Sodhi, i sur., 2021.). Istraživanja provedena u Latinskoj i Južnoj Americi pokazala su prisutnost više farmaceutskih tvari, među kojima je i amoksisilin prisutan u pitkoj i otpadnoj vodi. Ostaci farmaceutika pronađeni su na svim kontinentima, čak i u polarnim regijama koje se smatraju najočuvanijim okolišem na svijetu (Chaturvedi i sur., 2021.; Koch i sur., 2021.).

Farmaceutici su skupina tvari s vrlo širokim rasponom fizikalno-kemijskih svojstava i biokemijskih aktivnosti (Caracciolo i sur., 2014.). Mehanizmi djelovanja antibiotika su raznovrsni, a mogu uključivati procese poput inhibicije sinteze stanične stijenke, deoksiribonukleinske kiseline, ribonukleinske kiseline i proteina (Chaturvedi i sur., 2021.). Većina antibiotika ima kompleksnu organsku strukturu zbog čega su otporni na razgradnju tijekom obrade otpadnih voda (Reis, i sur., 2020.). Svojstva poput polarnosti, hidrofилnosti i hlapivosti dovode do negativnih učinaka na biološke sustave (Zhu i sur., 2021.). Najčešće se u otpadnim tokovima nalazi mješavina ovih spojeva, stoga je teško predvidjeti njihovo međusobno djelovanje te utjecaj na organizme (Caracciolo i sur., 2014.; Reis, i sur., 2020.). Različite skupine onečišćujućih tvari mogu se pronaći u otpadnim vodama farmaceutske industrije. Među njima su antibiotici, organski spojevi poput poliaromatskih ugljikovodika i fenola te teški metali (Shah i Shah 2020.).

Farmaceutski aktivni spojevi najčešće se mogu svrstati u neizravne izvore ksenobiotika. Mogu biti ispušteni u okoliš direktno iz tvornica u kojima se proizvode ili pak biti sastavni dio otpadnih voda bolnica u kojima se koriste u velikim količinama na svakodnevnoj bazi (Varsha i sur., 2011.; Caracciolo i sur., 2014.; Yasodara Liyanage i

Manage 2016.; Sodhi i sur., 2021.). Bolničke otpadne vode u najvećoj mjeri sadrže hormone, anestetike i antibiotike koji se mogu bioakumulirati u organizmu i prenositi na druge organizme putem hranidbenog lanca. Također valja spomenuti nekontrolirano i nepravilno odlaganje lijekova što predstavlja rizik od prodora takvih tvari u okoliš (Al-Ahmad i sur., 1999., Varsha i sur., 2011.; Caracciolo i sur., 2014.; Chaturvedi i sur., 2021.; Sodhi i sur., 2021.). Osim farmaceutika, koji su namijenjeni ljudskoj potrošnji, značajna količina koristi se i u poljoprivredi te u stočarstvu, odnosno uzgoju životinja i najčešće za poboljšanje i ubravanje njihovog rasta (Koch i sur., 2021.; Sodhi i sur., 2021.).

Nadalje, dokazana je prisutnost raznih skupina farmaceutika u okolišu, poput protuupalnih lijekova, analgetika, antidepresiva, antiepileptika i antiseptika još od 80-ih godina 20. stoljeća, no tek se nedavno počelo intenzivnije govoriti o ovome problemu. Navedeno nije zabrinjavajuće samo zbog očuvanja ekosustava, već predstavlja i rizik po zdravlje ljudi koji konzumacijom vode i hrane mogu doći u doticaj s tim tvarima (Al-Ahmad i sur., 1999., Caracciolo i sur., 2014.; Koch i sur., 2021.).

Istraživanja su pokazala da neki farmaceutici mogu poremetiti ili izmijeniti funkcioniranje endokrinog sustava, potaknuti otpornost patogenih mikroorganizama, ali u nekim slučajevima imati i štetan učinak na prirodne mikrobne zajednice i njihove funkcije u ekosustavu (Caracciolo i sur., 2014.). Većina istraživanja usmjerena je na proučavanje razvoja gena za otpornost na antibiotike kod bakterija, s obzirom da je to sve veći problem u liječenju raznih bolesti (Al-Gheethi i sur., 2016.; Yasodara Liyanage i Manage 2016.; Koch i sur., 2021.). U literaturi su dostupni podaci prema kojima se projicira da otpornost mikroorganizama na antibiotike može prouzročiti čak deset milijuna smrtnih slučajeva godišnje do 2050. godine (Chaturvedi i sur., 2021.). Ova pojava prepoznata je kao jedan od najvećih problema s kojima se susreću gotovo sve zemlje diljem svijeta. Svjetska zdravstvena organizacija svrstala je bakterijsku otpornost na antibiotike na listu tri najveće prijetnje zdravstvu koje se moraju riješiti u dvadeset prvom stoljeću (Koch i sur., 2021.).

Jedna od najviše korištenih skupina lijekova jesu nesteroidni protuupalni lijekovi. Koriste se za ublažavanje i liječenje simptoma upale, boli i vrućice kod ljudi i životinja, te obuhvaćaju jako velik broj lijekova. Najpoznatiji su naproksen, ibuprofen i diklofenak. Ova skupina lijekova vrlo je često detektirana u površinskim vodama, u koncentracijama koje se kreću od nekoliko desetaka ng L^{-1} do stotinu $\mu\text{g L}^{-1}$ (Varsha i sur., 2011.; Caracciolo i sur., 2014.).

Često korišteni lijekovi su i β -laktamski antibiotici koji uključuju penicilin, cefalosporin, karbapenem, amoksicilin i mnoge druge. Lijekovi iz skupine penicilina čine čak 70 % potrošnje antibiotika u mnogim zemljama. Specifični su po tome što u svojoj strukturi imaju β -laktamski prsten. Djeluju tako što napadaju bakterijsku staničnu stijenku, blokirajući sintezu peptidoglikana (Al-Gheethi i

Ismail 2014; Pang i sur., 2019.; Sodhi i sur., 2021.). Sve su češći slučajevi otpornosti bakterijskih mikroorganizama na ovu vrstu antibiotika, zahvaljujući primarno enzimima iz skupine β -laktamaza koje hidroliziraju β -laktamski prsten. Do sada je isprobano nekoliko tehnika uklanjanja ove skupine lijekova iz otpadnih voda. Među njima su ozoniranje, ultraljubičasto zračenje, apsorpcija, spaljivanje, fotoliza, hidroliza, reverzna osmoza i kemijska razgradnja. Međutim ove tehnike se nisu pokazale kao zadovoljavajuće rješenje zato što su skupe, nedostatne, a neke od njih uzrokuju stvaranje toksičnih nusprodukata. Zbog toga se javlja potreba za primjenom enzimske biorazgradnje antibiotika koja ima ogroman potencijal za rješavanje ove problematike (Al-Gheethi i Ismail 2014; Yasodara Liyanage i Manage 2016.; Yang C.-W. i sur., 2020.; Shah i Shah 2020.). Tragovi amoksicilina pronađeni su u okolišu te predstavljaju opasnost za ekosustav, kao i svi ostali farmaceutski spojevi. Istraživanja pokazuju da se amoksicilin ne uklanja u potpunosti u postrojenjima za obradu otpadnih voda što doprinosi njegovoj prisutnosti u vodenim ekosustavima (Baghapour i sur., 2014; Yang X. i sur., 2020.). Zbog jako česte upotrebe, bakterije iz okoliša kontinuirano dolaze u doticaj s određenim koncentracijama ovog antibiotika te su s vremenom neke vrste razvile otpornost na njega. Tragovi amoksicilina zabilježeni su diljem svijeta u raznim otpadnim tokovima i vodenim sustavima u koncentracijama izraženima u ng L^{-1} . U Indiji je zabilježena prisutnost amoksicilina i njegovih produkata razgradnje u neobrađenoj otpadnoj vodi u koncentraciji od 172 ng L^{-1} , a nakon prvog i drugog stupnja obrade ta je koncentracija u izlaznom toku postrojenja smanjena na $62,5 \text{ ng L}^{-1}$ (Sodhi i sur., 2021.).

Prema Direktivi 2013/39/EU Europskog parlamenta i Vijeća, a na temelju rezultata studije provedene o rizicima koje lijekovi predstavljaju za okoliš, razvija se strateški pristup onečišćenju voda farmaceutskim tvarima. Taj strateški pristup predlaže prema potrebi mjere koje je potrebno poduzeti kako bi se pristupilo rješavanju mogućih učinaka farmaceutskih tvari na okoliš u svrhu smanjenja ispuštanja, emisija i ispuštanja takvih tvari u vodni okoliš, uzimajući u obzir potrebe javnog zdravlja i isplativost predloženih mjera.

3.2. Postupci uklanjanja farmaceutika

Postupci koji se najčešće primjenjuju za uklanjanje farmaceutika su fizikalno-kemijski i biološki. Od fizikalno-kemijskih postupaka, napredni oksidacijski procesi koriste se za uklanjanje farmaceutika, ali imaju određena ograničenja kao što su stvaranje toksičnih nusprodukata, smanjenu učinkovitost i veću cijenu. Membranski procesi imaju najčešću primjenu za obradu otpadnih voda. Mikrofiltracija i ultrafiltracija nisu toliko učinkovite u uklanjanju farmaceutika zbog veličine pora. Upotreba nanofiltracijskih i reverzno osmotskih membrana zbog manje veličine pora zahtijevaju i veće financijske troškove (Taheran i sur., 2016.; Sodhi i sur., 2021.). Biološki postupci koji koriste mikrobiološki potencijal se vrlo

često primjenjuju u obradi industrijskih otpadnih voda iz farmaceutske industrije. Prihvatljivi su za okoliš uz mogućnost pretvorbe otpada u obnovljiv izvor energije. Razgradnja farmaceutika sa specifičnim mikrobiološkim kulturama postaje sve zanimljivija alternativa zbog ekonomskih razloga te niske mogućnosti stvaranja toksičnih nusprodukata (Zrnčević 2016.; Davarazar i sur., 2020.; Subbulakshmi i sur., 2021.).

4. ZAKLJUČAK

Industrijalizacija, urbanizacija, istraživanje prirodnih resursa i tehnološki napredak neki su od glavnih čimbenika

koji rezultiraju emisijom određene količine ksenobiotika u okoliš. Onečišćenje okoliša u bilo kojem obliku uzrokuje prije svega opasnost za ekosustav kao i mnoge zdravstvene rizike, što je navelo znanstvenike da se više usredotoče na utjecaje onečišćenja i njihovo smanjenje. Sudbina ksenobiotika ovisi o brojnim okolišnim uvjetima te prisutnosti i aktivnosti mikroorganizama koji posjeduju sposobnost biorazgradnje. Potencijal mikroorganizama da metaboliziraju ksenobiotičke spojeve prepoznat je kao učinkovito sredstvo te se biorazgradnja smatra jednim od važnih ekološki prihvatljivih procesa u uklanjanju takvih spojeva iz okoliša. ■

LITERATURA

- Al-Ahmad, A., Daschner, F. D., Kummerer, K. (1999): Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin g, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(2), 158-63. doi: 10.1007/s002449900501
- Al-Gheethi, A. A. S., Ismail, N. (2014): Biodegradation of pharmaceutical wastes in treated sewage effluents by *Bacillus subtilis* 1556WTNC. *Environmental Processes*, 1, 459-481. <https://doi.org/10.1007/s40710-014-0034-6>
- Al-Gheethi, A. A., Efaq, A. N., Mohamed, R. M., Norli, I., Kadir, M. O. (2016): Potential of bacterial consortium for removal of cephalixin from aqueous solution. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 24, 141-148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaubas.2016.09.002>
- Baghapour, M. A., Shirdarreh, M. R., Faramarian, M. (2014): Degradation of amoxicillin by bacterial consortium in a submerged biological aerated filter: volumetric removal modeling. *Journal of Health Sciences & Surveillance System*, 2(1), 15-25.
- Balabanova, B. (2017): *Bioavailability/phytostabilization of xenobiotics in soil action*, u: Zaffar Hashmi, M., Kumar, V., Varma, A., *Xenobiotics in the soil environment, monitoring, toxicity and management*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2>
- Caracciolo, A. B., Topp, E., Grenni, P. (2014): Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 25-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>
- Chaturvedi, P., Shukla, P., Giri, B. S., Chowdhary, P., Chandra, R., Gupta, P., Pandey, A. (2021): Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environmental Research*, 194, 110664. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110664>
- Dalton, H., Stirling, D. I., Quayle, J. R. (1982): *Co-metabolism*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. <http://www.jstor.org/stable/2395932>
- Davarazar, M., Mostafaie, A., Jahanianfard, D., Davarazar, P., Ghiasi, S. A. B., Gorchich, M., Nemati, B., Kamali, M., Aminabhavi, T. M. (2020): Treatment technologies for pharmaceutical effluents – A scientometric study, *Journal of Environmental Management*, 254, 109800. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109800>
- Diggle, S. P., Whiteley, M. (2020): Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860
- Errington, J., van der Aart, L. T. (2020): Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427. doi: 10.1099/mic.0.000922
- Goyal, P., Basniwal, R. K. (2017): *Environmental bioremediation: biodegradation of xenobiotic compounds*, u: Zaffar Hashmi, M., Kumar, V., Varma, A., *Xenobiotics in the soil environment, monitoring, toxicity and management*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2>
- Koch, N., Islam, N. F., Sonowal, S., Prasad, R., Sarma, H. (2021): Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>
- Kumar, M., Prasad, R., Goyal, P., Teotia, P., Tuteja, N., Varma, A., Kumar, V. (2017): *Environmental biodegradation of xenobiotics: role of potential microflora*, u: Zaffar Hashmi, M., Kumar, V., Varma, A., *Xenobiotics in the soil environment, monitoring, toxicity and management*, Springer, Cham.
- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, W., Bhatt, P., Chen, S. (2021): Recent advanced technologies for the characterization of xenobiotic-degrading microorganisms and microbial communities. *Frontiers*

- in *Bioengineering and Biotechnology*, 9:632059. doi: 10.3389/fbioe.2021.632059.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., Cheng, Z. (2019): Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Pelczar, M. J., Pelczar, R. M. (2022): Microbiology. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/microbiology>
- Qadir, A., Zaffar Hashmi, M., Mahmood, A. (2017): *Xenobiotics, types, and mode of action*, u: Zaffar Hashmi, M., Kumar, V., Varma, A. *Xenobiotics in the soil environment, monitoring, toxicity and management*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2>
- Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Nunes, O. C., Corvini, P. F. X. (2020): Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants - part II. *New Biotechnology*, 54, 13-27. doi: 10.1016/j.nbt.2019.08.003
- Shah, A., Shah, M. (2020): Characterisation and bioremediation of wastewater: A review exploring bioremediation as a sustainable technique for pharmaceutical wastewater. *Groundwater for Sustainable Development*, 11, 100383. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2020.100383>
- Sing, A., Ward, O. P. (2004): *Biodegradation and bioremediation*. Springer, Berlin.
- Singh, R. (2017): Biodegradation of xenobiotics - a way for environmental detoxification. *International Journal of Development Research*, 7(7), 14082-14087.
- Smitha, M. S., Singh, S., Singh, R. (2017): Microbial bio transformation: a process for chemical alterations. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Acces*. 4(2), 47-51. doi: 10.15406/jbmoa.2017.04.00085
- Sodhi, K. K., Kumar, M., Kumar Singh, D. (2021): Insights into the amoxicillin resistance, ecotoxicity, and remediation strategies. *Journal of Water Process Engineering*, 39, 101858. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101858>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., Zhang, D. (2020): *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19, 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Subbulakshmi, G., Debbarma, A., Sinha, A., Panda, S. (2021): Bio remediation of xenobiotic compound: Reclamation approach for environmental sustainability - A review. *Materials Today: Proceedings*, 47(21). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.07.144>
- Taheran, M., Brar, S. K., Verma, M., Surampalli, R. Y., Zhang, T. C., Valero, J. R. (2016): Membrane processes for removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) from water and wastewaters, *Science of the Total Environment*, 547, 60-77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.139>
- Varsha, Y. M., Naga Deepthi, C. H., Chenna, S. (2011): An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean up. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, S11, 1-10. doi: 10.4172/2155-6199.S11-001
- Yang, C.-W., Liu, C., Chang, B.-V. (2020): Biodegradation of amoxicillin, tetracyclines and sulfonamides in wastewater sludge. *Water*, 2(8), 2147. <https://doi.org/10.3390/w12082147>
- Yang, X., Guo, P., Li, M., Li, H., Hu, Z., Liu, X., Zhang, Q. (2020): Optimization of culture conditions for amoxicillin degrading bacteria screened from pig manure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 1973. doi: 10.3390/ijerph17061973
- Yasodara Liyanage, G., Manage, P. M. (2016): Evaluation of amoxicillin and sulfonamide removal by *Bacillus cereus*, *Enterobacter ludwigii* and *Enterobacter* sp. *Environment and Natural Resources Journal*, 14(1), 39-43. <http://dr.lib.sjp.ac.lk/handle/123456789/2946>
- Zhu, T., Su, Z., Lai, W., Zhang, Y., Liu, Y. (2021): Insights into the fate and removal of antibiotics and antibiotic resistance genes using biological wastewater treatment technology. *Science of the Total Environment*, 776, 145906. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110664>
- Zrnčević, S. (2016): Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode*, 96, 119-136.

THE ROLE OF ENVIRONMENTAL MICROORGANISMS IN THE BIODEGRADATION OF XENOBIOTICS

Abstract. As a result of accelerated industrialization, modernization, and growth of the world population, there is an increased emission of xenobiotics into all components of the environment. Xenobiotics are a numerous and diverse group of chemical substances that are responsible for extensive environmental pollution and cause changes in ecosystems. Due to their persistence and resistance in the environment, there is a great need for environmentally friendly degradation of these xenobiotic compounds. Microbial communities are capable of degrading a wide range of compounds, which is why they play an important role in the functioning of ecosystems. Thanks to their high metabolic potential, microorganisms can adapt to new substrates and produce enzymes responsible for degradation, which can be an effective means of detoxifying the environment. A thorough knowledge of microorganisms and a better understanding of the metabolic pathways involved in the removal of xenobiotics will allow the ultimate application of biodegradation.

Key words: biodegradation, xenobiotics, environmental microorganisms, environmental pollution

DIE ROLLE VON UMWELTMIKROORGANISMEN BEIM BIOLOGISCHEN ABBAU VON XENOBIOTIKA

Abstract. Durch beschleunigte Industrialisierung, Modernisierung und das Wachstum der Weltbevölkerung kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Xenobiotika in die Umwelt. Xenobiotika bilden eine zahlreiche und vielfältige Gruppe chemischer Substanzen, die für eine starke Umweltverschmutzung verantwortlich sind und Veränderungen in Ökosystemen verursachen. Aufgrund ihrer hohen Umweltpersistenz und Widerstandsfähigkeit besteht eine große Notwendigkeit, die Xenobiotikaverbindungen umweltverträglich abzubauen. Mikrobielle Gemeinschaften haben die Fähigkeit, eine Vielzahl von Verbindungen abzubauen, weswegen ihre Rolle für das Funktionieren des Ökosystems von Bedeutung ist. Dank des großen metabolischen Potenzials können sich Mikroorganismen an neue Substrate anpassen, wobei sie Enzyme produzieren, die für den Abbau verantwortlich sind, was ein wirksames Mittel zur Umweltentgiftung sein kann. Gründlicheres Wissen über Mikroorganismen und besseres Verständnis von Stoffwechselwegen in der Entfernung von Xenobiotika werden einen gezielten Einsatz des biologischen Abbaus ermöglichen.

Schlüsselwörter: biologischer Abbau, Xenobiotika, Umweltmikroorganismen, Umweltverschmutzung