

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Antonija Kovačević
Ema Lovrinčić

Biorazgradnja bisfenola A u vodi

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Dajane Kučić Grgić, znan. sur. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

T – temperatura, °C

t – vrijeme, min

V – volumen, dm³

Grčki simboli

γ – masena koncentracija, mg dm⁻³

λ – valna duljina, nm

κ – električna provodnost, $\mu\text{S cm}^{-1}$

Kratice

OG – optička gustoća

BPA – bisfenol A

BSW – biootpad

atm – standardna atmosfera

P – pokus

Indeksi

0 – početna vrijednost

$^{\circ}$ – stupanj

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Bisfenol A.....	2
2.1.1. BPA u okolišu	3
2.1.2. Utjecaj BPA na ljudsko zdravlje.....	4
2.2. Otpadne vode	5
2.2.1. Industrijske otpadne vode	6
2.3. Postupci obrade otpadnih voda.....	6
2.3.1. Fizikalni procesi obrade otpadnih voda	8
2.3.2. Fizikalno - kemijski procesi obrade otpadnih voda	8
2.3.3. Biološki procesi obrade otpadnih voda.....	8
2.4. Bioremedijacija otpadne vode onečišćene bisfenolom A.....	9
2.4.1. Biorazgradnja BPA bakterijama	11
2.4.1.1. <i>Pseudomonas</i> sp.	12
2.4.1.2. <i>Streptomyces</i> sp.	13
2.4.2. Biorazgradnja BPA gljivama	14
2.4.3. Biorazgradnja BPA algama.....	15
2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	16
2.5.1. Razvoj metode	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Bisfenol A	18

3.1.2. Bakterijske kulture	18
3.2. Kemikalije i otopine	20
3.2.1. Priprema hranjive podloge	20
3.3. Instrumenti i aparatura.....	21
3.4. Analitički postupci.....	
3.4.1. Razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	25
3.4.2. Određivanje pH-vrijednosti i koncentracije kisika	26
3.4.3. Određivanje optičke gustoće.....	26
3.4.4. Bojanje bakterija po Gramu	26
3.4.5. Priprema vlažnog preparata i mikroskopiranje bakterija	27
3.5. Postupci provedenih ispitivanja.....	28
3.5.1. Priprava suspenzija bakterija	28
3.5.2. Biorazgradnja BPA s različitim bakterijskim kulturama	28
3.5.3. Utjecaj pH vrijednosti na biorazgradnju BPA	29
3.5.4. Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA	30
3.5.5. Utjecaj koncentracije BPA na biorazgradnju BPA.....	30
3.5.6. Utjecaj temperature na biorazgradnju BPA	31
4. REZULTATI	33
4.1. Razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	33
4.2. Biorazgradnja BPA s različitim kulturama.....	35
4.3. Utjecaj pH-vrijednosti na biorazgradnju BPA.....	36
4.4. Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA.....	39

4.5. Utjecaj koncentracije BPA na biorazgradnju BPA.....	42
4.6. Utjecaj temperature na biorazgradnju BPA.....	49
5. RASPRAVA.....	53
5.1. Razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	53
5.2. Biorazgradnja BPA s različitim kulturama.....	54
5.3. Utjecaj različitih pH-vrijednosti na biorazgradnju BPA	55
5.4. Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA.....	56
5.5. Utjecaj različitih koncentracija na biorazgradnju BPA	57
5.6. Utjecaj različitih temperatura na biorazgradnju BPA.....	58
6. ZAKLJUČCI	60
7. LITERATURA
SAŽETAK.....	66
ABSTRACT	67
ZAHVALE	68
ŽIVOTOPIS.....	69

1. UVOD

Na svojstva raznih materijala koji se primjenjuju u svakodnevnom životu utječe se dodatkom raznih anorganskih i organskih tvari. Jedan od njih je i toksični organski spoj, bisfenol A (BPA), koji je svoju primjenu našao uglavnom u polikarbonatima i epoksi smolama.¹ BPA se nalazi u raznim proizvodima kao što su ambalaže za hranu i piće, bočice za djecu, kuhinjska pomagala, elektronička oprema, boje te metalne konzerve za hranu i piće s kojima su ljudi svakodnevno u doticaju.² U posljednjih osamdeset godina ispitalo se djelovanje BPA na ljude, životinje i okoliš. Krajem dvadesetog stoljeća otkriven je njegov negativan utjecaj na zdravlje ljudi te je 1996. godine proglašen supstancom opasnom po ljudsko zdravlje.³ Dokazano je da sveprisutni BPA utječe na hormonalnu ravnotežu ljudi i životinja, fetuse, novorođenčad i malu djecu. Izloženost BPA može dovesti do povećanja ili smanjenja broja kromosoma kod fetusa što dovodi do pobačaja ili genetskog poremećaja djeteta (npr. Downov sindrom).³

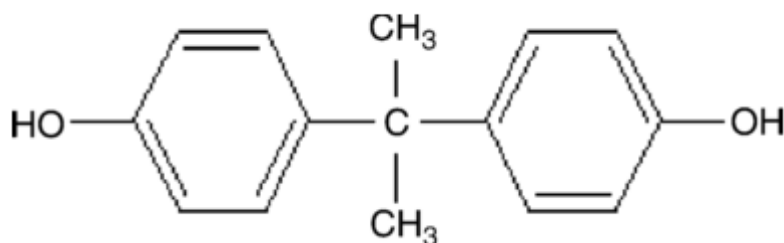
Povećanom upotrebom proizvoda koji sadržavaju BPA, povećava se i njegova koncentracija u okolišu. Iako mu je kratki životni vijek, BPA predstavlja problem zbog konstantnog otpuštanja u okolinu. U tlo i vode dospijeva tijekom kemijske proizvodnje, transporta ili prerade te nepravilnim odlaganjem plastičnog otpada. Razni mikroorganizmi, *Pseudomonas* sp.⁴, *Streptomyces* sp.^{5, 6}, *Aspergillus* sp.^{7, 8}, *Chlorella fusca* var. *vacuolata*⁹, koji se nalaze u tlu i vodi u mogućnosti su razgraditi BPA. Budući da sva živa bića na Zemlji trebaju vodu, koja je nezamjenjivo prirodno bogatstvo, nužno je da ona ostane neonečišćena. Najveće neprijatelje okolišu predstavljaju otpadne vode, koje uz razne druge tvari sadržavaju i BPA.

U ovom radu provelo se uklanjanje BPA iz vodene otopine procesom biorazgradnje. Cilj je bio pronaći optimalne uvjete pri kojima se BPA najbolje uklanja. Pokusi biorazgradnje BPA ispitali su se na tri različita mikroorganizma, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* te su ispitani različiti čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje BPA poput temperature, pH-vrijednosti, optičke gustoće bakterijske suspenzije i početne koncentracije BPA.

2. OPĆI DIO

2.1. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA), odnosno, 2,2-bis-(4-hidroksifenil)propan, prvi puta je sintetiziran 1905. godine ali nije imao značajnu ulogu sve dok se nije razvila industrija proizvodnje polikarbonata^a i poliepoksida^b gdje je BPA glavna komponenta. Bisfenol A, ili kraće BPA je kemijski, organski spoj koji se sastoji od dva fenola, formule C₁₅H₁₆O₂ (slika 2.1.). BPA je u čvrstom stanju bijeli ili svijetlo smeđi prah, čije je talište 150 °C – 159 °C, vrelište je 220°C, gustoća 1,195 g dm⁻³, a topivost u vodi iznosi 100 mg dm⁻³.



Slika 2.1. Strukturna formula Bisfenola A.²

BPA je osnovna građevna jedinica u proizvodnji polikarbonata, epoksi smola, stomatoloških potrepština te drugih materijala. Polikarbonati se koriste u proizvodnji plastičnih ambalaža za hranu i piće, automobila, bočica za djecu, pakiranje lijekova, elektroničke opreme, kuhinjskih pomagala, optičkih medija i raznih drugih materijala.¹ Epoksi smole koriste se u industriji umjetnih materijala, boja i adheziva, te kao razne vrste zaštitnih prevlaka, osobito kod metalnih konzervi koje sadrže hranu i piće (tablica 2.1.), bačvi za vino, dok se u stomatologiji koriste kao ispuna za zube.¹ Polikarbonati se koriste zbog svoje lakoće, izdržljivosti, velikog modula elastičnosti te visokog tališta. Najviše se koristi u proizvodnji plastike i time ulazi u život svakog čovjeka. BPA može prijeći iz ambalaže u hranu ili piće koje se nalazi unutar nje. Glavni uzrok, koji potiče prijenos BPA iz ambalaže je zagrijavanje proizvoda prilikom proizvodnje ili tijekom visokih ljetnih temperatura.²

^a Polikarbonati su termoplastični polimeri koji sadrže karboksilne skupine, a njihova kemijska formula je (-O-(C=O)-O-)_n.

^b Poliepoksidi su polimeri nastali polimerizacijom epoksida - tročlanih cikličkih etera.

Tablica 2.1. Koncentracija BPA u konzerviranoj hrani.¹

Konzervirana hrana	Broj uzoraka	Prosječna koncentracija BPA ^c (ng/g)	Raspon (ng/g)
Meso	8	130	17-602 ¹⁰
	5	110	17-380 ¹¹
	6	21	<20-98 ¹²
Riba	10	22	NO-43 ¹¹
	8	23	<20-109 ¹²
	9	30	<5-102 ¹³
Voće i povrće	14	25	2-75 ¹⁰
	9	42	NO-95 ^{d 14}
	10	25	9-48 ¹¹
	10	20	NO-76 ¹⁵
	33	6	<10-24 ¹²
Piće	11	<1	NO-<7 ^{e 11}
	80	18	NO-212 ¹⁶
	4	<10	-12
Mliječni proizvodi	3	31	21-43 ¹⁷
Nadomjesna prehrana za dojenčad	14	5	0,1-13 ¹⁸

2.1.1. BPA u okolišu

Bisfenol A je sveprisutan kemijski spoj u okolišu, unatoč njegovom kratkom životnom vijeku, zbog konstantnog otpuštanja u okolinu.

Do otpuštanja BPA u okolinu može doći tijekom kemijske proizvodnje, transporta ili prerade. Nakon primarnih potrošača BPA nalazimo u komunalnim otpadnim vodama, raznim odlagalištima, prilikom spaljivanja otpada te nepravilnim odlaganjem plastičnih boca. Koncentracija BPA u površinskim vodama varira ovisno o lokaciji, razdoblju uzorkovanja i metodama obrade rezultata.

^c Količine koje nije moguće odrediti izražene su kao nula. NO – nije određeno

^d Količina BPA u zemlji; količine u vodi su ispod razine očitavanja (<5 ng/g)

^e <7, zapaženo, ali nije moguće precizno odrediti količinu

Male koncentracije BPA iz okoliša se mogu ukloniti prirodnim putem, fotorazgradnjom, jer je fotonestabilan, te mikroorganizmima (*Pseudomonas* sp.,⁴ *Streptomyces* sp.^{5, 6}, *Aspergillus* sp.^{7, 8}) iz okoliša.¹⁹ Povećane koncentracije BPA u okolišu te nusprodukti koji nastaju razgradnjom BPA predstavljaju opasnost za okoliš i čovjeka. Iako je u većini površinskih voda koncentracija BPA ispod 1 mg dm⁻³, ona može varirati ovisno o dubini na kojoj se koncentracija mjeri.¹⁹

2.1.2. Utjecaj BPA na ljudsko zdravlje

Dugi niz godina mislilo se da BPA ne utječe na ljudsko zdravlje, međutim 90-ih godina 20. stoljeća počelo se pobliže promatrati BPA i otkriven je njegov negativan učinak na ljudsko zdravlje.^{3 3} Godine 1996., od strane Europske komisije, BPA je zabilježen kao supstanca opasna po ljudsko zdravlje.³ Pokazalo se da BPA utječe na ravnotežu hormona kod ljudi i životinja, odnosno uzrokuje poremećaje endokrinog sustava. Izlaganje Bisfenolu A može biti najviše štetno za fetuse, novorođenčad te malu djecu zbog nedostatka povratne regulacije aktivnosti, sinteze i eliminacije hormona. Izloženost BPA može rezultirati genetskim promjenama kod fetusa tj. može doći do povećanja ili smanjenja broja kromosoma što rezultira pobačajem ili genetskim poremećajem djeteta (npr. Downov sindrom).³ Zbog toga se označava oznakom opasnosti Xn (štetno). Svrstan je u 3. skupinu prema reproduktivnoj toksičnosti te od oznaka upozorenja pridodani su mu R 37 (nadražuje dišni sustav), R 41 (opasnost od teških ozljeda očiju), R 43 (u dodiru s kožom može izazvati preosjetljivost) i R 62 (moguća opasnost smanjenja plodnosti)¹ kao što je prikazano na slici 2.2. Upozorenja uključuju S 2 (čuvati izvan dohvata djece), S 26 (ako dođe u dodir s očima odmah isprati s puno vode i zatražiti savjet liječnika), S 36/37 (nositi odgovarajuću zaštitnu odjeću i rukavice), S 39 (nositi zaštitna sredstva za oči/lice) i S 46 (ako se proguta hitno zatražiti savjet liječnika i pokazati naljepnicu ili spremnik).¹



Slika 2.2. Oznake upozorenja na bočici Bisfenola A.

2.2. Otpadne vode

Otpadne vode su sve potencijalno onečišćene tehnološke, kućanske, oborinske i druge vode. Nastaju uporabom vode iz brojnih vodoopskrbnih sustava za određene namjene, pri čemu dolazi do promjena njihovih prvotnih značajki: fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških.^{20,21,22} One također sudjeluju u takozvanom hidrološkom ciklusu. Jednostavnije rečeno, vode uzete za opskrbu stanovništva nakon upotrebe se pročišćavaju i vraćaju u okoliš. U otpadne vode svrstavaju se: **kućanske otpadne vode** - otpadne vode nastale uporabom sanitarnih trošila vode u kućanstvu, hotelima, uredima, kinima i u objektima industrijskih pogona koji također imaju izgrađene sanitarne čvorove za radnike, **industrijske otpadne vode** - nastale upotrebom vode u procesu rada i proizvodnje u industrijskim i drugim proizvodnim pogonima te rashladne vode onečišćene temperaturom te **oborinske otpadne vode** nastale od oborina koje se više ili manje onečišćuju u doticaju s nižim slojevima atmosfere, površinama tla, krovovima i slično. Ove tri grupe otpadnih voda uobičajeni su sastav komunalnih otpadnih voda. Mogu im se priključiti i otpadne vode od pranja javnih prometnih površina i eventualno procjedne vode s odlagališta neopasnog otpada.^{20, 21, 22}

2.2.1. Industrijske otpadne vode

Različiti tehnološki procesi u industrijama uvjetuju i različite sastave otpadnih voda i prema tome imamo dvije osnovne grupe: **biološki razgradive** - one koje se mogu miješati s gradskim otpadnim vodama, odnosno odvoditi zajedničkom kanalizacijom (npr. iz nekih prehrambenih industrija) te **biološki nerazgradive** - one koje se moraju podvrgnuti prethodnom postupku pročišćavanja prije miješanja s gradskom otpadnom vodom (npr. iz kemijske, metalne industrije).²³ Često se još spominju onečišćene vode i uvjetno čiste pri čemu se u uvjetno čiste vode ubrajaju vode koje uporabom nisu pretrpjele značajne promjene fizikalnih i kemijskih svojstava te se mogu bez predobrade ispustiti u kanalizaciju ili prijemnik.²⁴ Većina industrija upotrebljava znatne količine vode kao rashladne vode, pri čemu temperatura vode raste, velik dio vode ispari, a posljedica je povećanje koncentracija soli u otpadnoj vodi i toplinsko onečišćenje vode. Svaka industrija čini specifičan problem po temeljnim sastojcima u otpadnoj vodi, a pojedine industrijske otpadne vode mogu sadržavati sastojke koji su otrovni ili teško razgradivi te štetno utječu na okoliš. To su teški metali, kiseline, lužine, nafta i naftni derivati, masti i mineralna ulja, radioaktivni izotopi, sintetski kemijski spojevi, BPA i drugo. Prije nego što se takve vode priključe na gradsku kanalizacijsku mrežu potrebno ih je prethodno obraditi u cilju uklanjanja toksičnih i postojanih tvari koje se gomilaju u živom organizmu i sprječavaju biološku razgradnju, odnosno onemogućavaju rad uređaja za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda te kako bi se iz otpadnih voda izdvojile eksplozivne, korozivne i zapaljive tvari koje oštećuju kanalizacijske objekte i cijevi. pH-vrijednost gradskih otpadnih voda kreće se oko 7-7,5 dok je pH-vrijednost industrijskih otpadnih voda uglavnom veća ili manja od toga.^{20, 24}

2.3. Postupci obrade otpadnih voda

Da bi se obradile otpadne vode potrebno je provesti odgovarajuće fizikalne, fizikalno-kemijske i biološke procese ili kombinaciju više navedenih procesa. Obrada se provodi u nekoliko stupnjeva, točnije njih četiri. U svakom stupnju uklanja se točno određena vrsta nečistoća počevši od krupnijih čestica prema sitnijim.

Uklanjaju se suspendirane i koloidne čestice biorazgradivih organskih tvari, postojanih organskih tvari i otopljenih anorganskih tvari iz otpadne vode. Redoslijed, veličina čestica koja se uklanja, svrha te mehanizmi obrade prikazani su u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Klasifikacija procesa obrade otpadne vode.²⁵

Veličina čestica	Stupanj obrade	Svrha stupnja obrade	Procesi obrade	Glavna onečišćenja	Mehanizam obrade
10 cm - 1 cm	prethodni	- zaštita sljedećih procesa	- rešetke, pjeskolov, mastolov	- drvo, kamenje, papir, šljunak	- fizikalni
1 mm – 1 μm	prvi (primarni)	- ispuštanje u neosjetljiv prijemnik - priprema za drugi stupanj	- taloženje u primarnom taložniku - taloženje uz flokulante	- suspendirane tvari - teški metali, fosfor, biorazgradive organske tvari	- fizikalni - fizikalno - kemijski
0,1 μm - 10 nm	drugi (sekundarni)	- obrada za ispuštanje u većinu prijemnika	- aerobno aktivnim muljem, biološka filtracija, anaerobna obrada, koagulacija, flokulacija	- organske tvari, dušik i fosfor	- biološki - fizikalno - kemijski
1 nm	treći (tercijarni)	- ispuštanje u „osjetljiv“ prijemnik	- filtracija - dezinfekcija (Cl ₂ , O ₃)	- suspendirane tvari - patogeni mikroorganizmi	- fizikalni - kemijski
1 nm	napredni	- zahtjev za visokom kakvoćom izlaznog toka	- ionska izmjena, membranska filtracija, adsorpcija - fotooksidacija	- dušik, metali, anorganske tvari - postojani organski spojevi	- fizikalni - kemijski

2.3.1. Fizikalni procesi obrade otpadnih voda

U fizikalne procese obrade otpadnih voda ubrajaju se metode za uklanjanje grubih i plivajućih tvari iz otpadnih voda: rešetanje, izravnavanje/ujednačavanje (egalizacija), miješanje, taloženje (sedimentacija), isplivavanje (flotacija), cijedenje (filtriranje) te adsorpcija.²⁴ Rešetke u prethodnom stupnju obrade otpadne vode zadržavaju krupne inertne frakcije taloživih tvari. Rešetke su vrlo bitne jer štite opremu od oštećenja ili začepljenja u daljnjim stupnjevima obrade. Pjeskolov i mastolov također se primjenjuju u prethodnoj obradi, a sama imena govore nam čemu služe. Pjeskolov uklanja čestice veće od 0,2 mm kao što su pijesak, šljunak i sitne čestice minerala, dok mastolov uklanja masti i ulja prije sljedećeg stupnja obrade otpadnih voda. Taložnici se primjenjuju u prvom stupnju obrade za selektivno uklanjanje taloživih čestica, a nakon drugog stupnja za odvajanje biološkog mulja ili kemijskih taloga.²⁵ Proces adsorpcije je najčešće korišten fizički proces u kojem otopljene molekule (adsorbati) prijanjaju na čvrstu površinu (adsorbens) pod utjecajem sila privlačenja. Na njega utječu brzina protoka vode, karakteristike suspenzije i adsorbensa, te postupak proizvodnje adsorbensa.²⁵

2.3.2. Fizikalno - kemijski procesi obrade otpadnih voda

U fizikalno - kemijske procese obrade otpadnih voda podrazumjevaju se: neutralizacija, koagulacija, flokulacija, oksidacija i redukcija, dezinfekcija, ionska izmjena te membranski procesi.²⁴ Razrjeđivanje, kao jedan od fizikalnih postupaka, učestalo se primjenjuje u kombinaciji s biološkim postupkom zbog osjetljivosti mikroorganizama.²

2.3.3. Biološki procesi obrade otpadnih voda

Osnovna dva procesa biološke obrade otpadnih voda su aerobni i anaerobni proces. U aerobnim uvjetima (prisutan je kisik) obrada otpadnih voda provodi se u bioreaktoru s aktivnim muljem ili u reaktoru s biofilmom.²⁵ U sustavu s aktivnim muljem (koji se sastoji od bakterija, protozoa, algi, kvasaca i metazoa) mikroorganizmi su suspendirani u otpadnoj vodi i s vremenom tvore pahuljice aktivnog mulja, dok u sustavima s biofilmom mikroorganizmi tvore biofilm na površini inertnog materijala kojim je ispunjen reaktor.²⁵

Anaerobni procesi se sastoje od niza mikrobioloških procesa, a mikroorganizmi mogu biti suspendirani u otpadnoj vodi ili imobilizirani na inertnom materijalu.

Organske otpadne tvari u vodi anaerobno se razgrađuju u tri stupnja. Najprije se velike organske molekule (kao što je BPA) hidrolizom razgrađuju do svojih monomera, zatim slijedi kiselinska i metanska fermentacija gdje se organske kiseline pomoću acetogenih bakterija prevode u CO₂ i H₂O, a pomoću metanogenih bakterija stvara se metan, bioplin koji se može koristiti kao energent.^{23, 24}

2.4. Bioremedijacija otpadne vode onečišćene bisfenolom A

Bioremedijacija je proces u kojem se koristi metabolički potencijal mikroorganizama (bakterija i gljiva) u svrhu sanacije onečišćenih područja. Mikroorganizmi pomoću svojih enzima^f razgrađuju ksenobiotike^g (onečišćujuće tvari) u tlu ili vodi te ih transformiraju u manje opasne produkte sve do konačne degradacije do ugljičnog dioksida i vode.^{27, 28} Mnogi čimbenici poput temperature, vlage, pH-vrijednosti, koncentracije kisika i razni drugi utječu na proces bioremedijacije.²⁷ Za uspješnost bioremedijacije vrlo je bitno stimulirati uvjete kako bi bili što sličniji uvjetima okoliša. Iako pojedini mikroorganizmi mogu preživjeti i ekstremne uvjete, većina mikroorganizama najbolje raste pri optimalnim uvjetima koji su dani u tablici 2.3.²⁸

Tablica 2.3. Čimbenici koji utječu na proces bioremedijacije.²⁸

Čimbenici	Vrijednosti
Udio vlage / %	40-60
pH / -	6,5-8,0
Udio kisika / %	10-40
Nutrijenti	C:N:P=100:10:1
Temperatura / °C	20-35

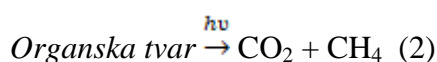
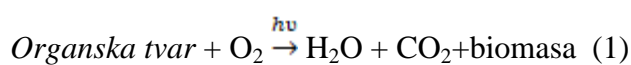
Bioremedijacija se brže odvija uz prisutnost kisika tj. u aerobnim uvjetima stoga je potrebno konstantno dovoditi kisik. U protivnom što je veće onečišćenje tla, koncentracija kisika će se brže smanjivati dok potpuno ne nestane.

^f Enzim je protein koji katalizira kemijske reakcije u živom organizmu.^{29, 30}

^g Pojam ksenobiotik (engl. xenobiotics) se često upotrebljuje u kontekstu onečišćujuće tvari i njihovog učinka na životne zajednice, budući su ksenobiotici strani prirodi - biološkim sustavima, odnosno to su tvari koje ne postoje u prirodi nego ih je čovjek načinio – sintetizirao.³¹

Nedovoljna vlažnost ograničava rast bakterija, a ukoliko se udio vlage smanji ispod 10 %, bakterije ugibaju. Prevelika vlažnost smanjuje aeraciju tla.²⁸ Za većinu bakterija optimalna je pH vrijednost oko 7 (tj. neutralan pH) i temperatura između 15°C i 45°C.²⁸ Također, potrebno je poznavati o kojoj se onečišćujućoj tvari radi, njenu koncentraciju, lokalitet i prisutost mikroorganizama.²⁷

Proces bioremedijacije može se obavljati u aerobnim ili anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima mikroorganizmi koriste kisik te razgrađuju onečišćujuću tvar do ugljičnog dioksida (CO₂) i vode (H₂O), stvarajući pri tome karakterističnu biomasu (jednadžba 1.). U anaerobnim uvjetima mikroorganizmi ne koriste kisik, a kao produkt nastaje plin metan (jednadžba 2.).²⁷



Proces bioremedijacije može se provesti *in situ* i *ex situ*, odnosno onečišćeno tlo se može obraditi na mjestu nastanka onečišćenja ili se vrši iskop prije početka obrade. *In situ* bioremedijacija omogućava obradu onečišćenog tla ili vode na mjestu nastanka onečišćenja pri čemu se smanjuju ukupni troškovi iskopa i transporta onečišćenog tla ili vode. Nedostatci *in situ* bioremedijacije su ograničenost dubine zemljišta do koje je bioremedijacija učinkovita te slabija kontrola i prilagodba uvjeta provedbe bioremedijacije. Također, potrebno je onemogućiti ispiranje onečišćujućih tvari u podzemne vode i druge sustave.

Ex situ tehnologija je proces pri kojem se vrši iskop tla te se obrada onečišćenog tla može obaviti na istoj lokaciji korištenjem vodonepropusnih folija ili se tlo može transportirati u postrojenje za obradu otpada, što povećava ukupne troškove obrade.

Prednosti *ex situ* tehnologije su dobar monitoring uvjeta i napretka bioremedijacije, te nemogućnost procjeđivanja otpadnih voda.²⁸

Proces bioremedijacije ksenobiotika u okolišu može biti dugotrajan pa se često podešava pH-vrijednost, udio vlage i sl., odnosno uvjeti za rast i razvoj mikroorganizama. Također se inokuliraju odgovarajući mikroorganizmi kako bi proces bio učinkovitiji i brži. Prvi proces bioremedijacije se naziva biostimulacija, a drugi bioaugmentacija.

U procesu bioaugmentacije koriste se mikroorganizmi koji posjeduju enzime koji su odgovorni za razgradnju određene onečišćujuće tvari, a u većini slučajeva su to mikroorganizmi koji su izolirani iz onečišćenog tla ili vode.³² U tablici 2.4. dan je popis mikroorganizama koji su korišteni u procesu bioremedijacije BPA.

Tablica 2.4. Mikroorganizmi koji razgrađuju BPA.²

MIKROORGANIZAM	VRSTA
Bakterije	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> FJ-4 ³³
	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁴
	<i>Pseudomonas putida</i> ⁴
	<i>Streptomyces</i> sp. ⁵
	<i>Streptomyces</i> sp. AOI ⁶
Gljive	<i>Pleurotus oestreaus</i> O-48 ³⁴
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME-446 ³⁵
	<i>Trametes versicolor</i> IFO-7043 ³⁵
	<i>Trametes villosa</i> ^{36,37}
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME-446 ³⁸
	<i>Trametes versicolor</i> IFO-6482 ³⁸
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ⁷
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> NFRI-1012 ⁸
	<i>Fusarium moniliforme</i> 2-2 ⁸
	<i>Aspergillus terreus</i> MT-13 ⁸
	<i>Emericella nidulans</i> MT-98 ⁸
	<i>Stereum hirsutum</i> ³⁹
	<i>Heterobasidium insulare</i> ³⁹
Planktoni	<i>Chlorella fusca</i> var. <i>vacuolata</i> ⁹
	<i>Nannochloropsis</i> sp. ⁴⁰
	<i>Chlorella gracilis</i> ⁴⁰

2.4.1. Biorazgradnja BPA bakterijama

Dokazano je da se BPA može razgraditi pomoću bakterija iz tla, rijeka te postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, koja koriste razne bakterije kako bi uklonili BPA iz otpadnih voda.^{2, 19, 41} U rijekama se nalazi puno vrsta bakterija koje imaju mogućnost razgradnje BPA do nekog stupnja (40 od 44 bakterija izoliranih iz različitih rijeka), ali je jako malo onih bakterija koje mogu razgraditi BPA više od 90 % (samo 6 od 40).²

Prosječno vrijeme razgradnje BPA bakterijama iz rijeke je manje od 5 dana.² Na biorazgradnju bakterijama utječe najviše temperatura. Pri 20°C i 30°C BPA se razgradi u vremenskom razdoblju od 4 do 7 dana, dok pri temperaturi od 4°C razgradnja traje 20 dana.²

2.4.1.1. *Pseudomonas* sp.

Pripadnici roda *Pseudomonadaceae* bakterije su široko rasprostranjene u tlu, vodi, biljkama i životinjama. Zahtijevaju vlažno okruženje. Rod *Pseudomonas* obuhvaća gram-negativne^h, nefermetativne, pokretne, aerobne štapiće, od kojih neki stvaraju vodotopljive pigmente.⁴² Većina sojeva proizvodi jedan ili više pigmenata, uključujući piocijanin (plavo-zeleni), pioverdin (žuto-zeleni i fluorescentni) i piorubin (smeđe-crveni).^{43,44} *Pseudomonadaceae* su kratki, ravni ili lagano zakrivljeni gram-negativni štapići, dužine 1,5 do 4 µm, a širine od 0,5 do 1 µm. To su aerobne bakterije koje energiju stvaraju oksidacijom, a ne fermentiraju šećere.⁴² Rastu na temperaturi od 25°C do 37°C te su široko rasprostranjeni mikroorganizmi koji imaju mogućnost preživljavanja u različitim uvjetima.^{43,44} *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas putida* su jedne od rijetkih bakterija sa visokim stupnjem razgradnje BPA. One mogu razgraditi oko 90 % BPA unutar 10 dana.²

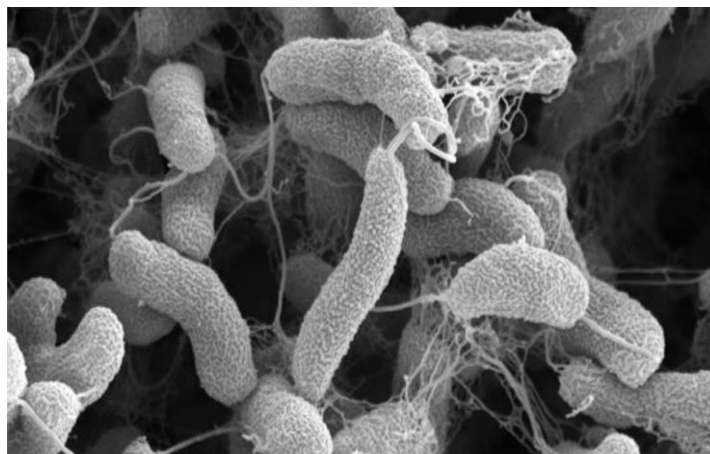
Pseudomonas putida (slika 2.3.) je rod bakterija koju nalazimo u tlu, a zbog svojih obilježja zanimljiva je u primjeni u ekologiji i poljoprivredi. Osnova zanimanja za ovu bakteriju je sposobnost nekih sojeva *P. putide* za razgradnju organskih toksičnih spojeva. Prema istraživanjima *P. putida* može razgraditi aromatske i alifatske ugljikovodike.⁴⁵

Pseudomonas aeruginosa (slika 2.4.) je najznačajnija vrsta roda *Pseudomonas*. Ona ima sposobnost naglog rasta, te posjeduje brojne čimbenike virulencije i toksičnosti. *Pseudomonas aeruginosa* najčešće uzrokuje infekcije kod osoba sa oslabljenim imunološkim sustavom i infekcije, respiratornog sustava, kože, oka i mokraćnog sustava.²⁹

^h Bakterije koje imaju staničnu stjenku koja sadrži tanak sloj peptidoglikana, lipoproteine, lipopolisaharide, fosfolipide i proteine.^{29, 30}



Slika 2.3. *Pseudomonas putida* pod elektronskim mikroskopom.⁴⁶



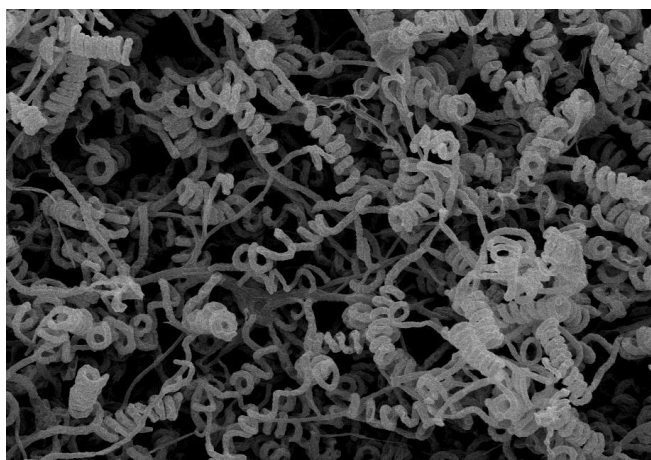
Slika 2.4. *Pseudomonas aeruginosa* pod elektronskim mikroskopom.⁴⁷

2.4.1.2. *Streptomyces* sp.

Streptomyces je bakterija iz roda *Aktinomiceta*, gram pozitivnih filamentoznih bakterija (bakterija koje rastući formiraju duge niti) (slika 2.5.). Ne stvaraju endosporeⁱ, spororastuće su i zahtijevaju posebne uvjete za rast. Filamenti (niti) im se granaju i često stvaraju micelije pa sličje gljivama, ali su vrlo nježni i tanki. Žive slobodno u prirodi, osobito u tlu gdje razgrađuju proteine, celulozu i druge organske tvari.

ⁱ Endospore su visokorezistentne bakterijske spore što se razvijaju unutar roditeljskih stanica. Stvaraju ih samo gram pozitivne bakterije, a mogu preživjeti u ekstremnim uvjetima (npr. visoke temperature)^{29, 30}

Koriste se u biotehnologiji za heterolognu ekspresiju proteina.⁴⁸ Problem može biti kada se proteini ne raspoređuju pravilno čime postaju netopljivi, talože se i dolazi do gubitka bioaktivnosti produkta. Njegova svojstva lučenja (sekrecijski mehanizmi) predstavljaju prednost za industrijsku proizvodnju heterolognog eksprimiranog proteina čime pojednostavljuje kasniju fazu pročišćavanja. Zbog toga je *Streptomyces* zahvalniji za uporabu od *Escherichia coli* i *Bacillus*. Koristi se za proizvodnju gotovo svih bioaktivnih proizvoda kao antibiotika.^{42, 48} *Streptomyces* sp. se pokazala kao najbolja bakterijska kultura za razgradnju BPA, razgradila je više od 90 % BPA unutar 10 dana.²

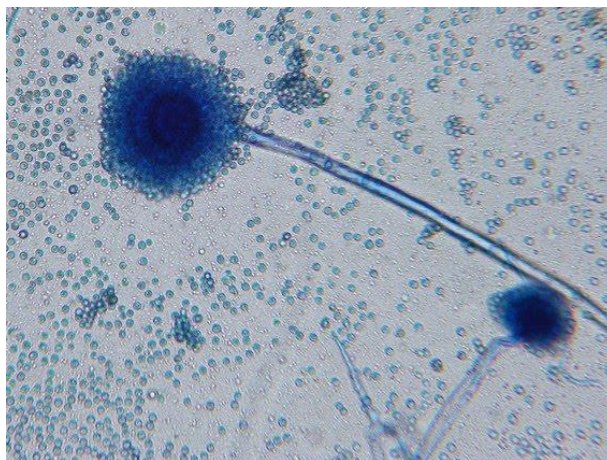


Slika 2.5. *Streptomyces* sp. pod elektronskim mikroskopom.⁴⁹

2.4.2. Biorazgradnja BPA gljivama

Kao i kod bakterija, mnoge gljive mogu razgraditi BPA do nekog stupnja, ali za potpunu (ili skoro potpunu) razgradnju broj gljiva je ograničen. *Fusarium sporotrichioides* NFRI-1012, *Fusarium moniliforme* 2-2, *Aspergillus terreus* MT-13, *Emericella nidulans* MT-98, *Irepex lacteus*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Polyporellus brumalis*, *Schizophyllum commune*, *Plerutus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* (slika 2.6.) i *Pleurotus pulmonarius* su gljive kojima se postiže najbolja razgradnja BPA.^{2, 50, 51} *Irepex lacteus* može razgraditi 99,4 % 50 mg dm⁻³ BPA unutar 3 sata te 100 % unutar 12 sati, dok *Trametes versicolor* razgrađuje 98,2 % BPA iste koncentracije za 12 sati. Pri početnim uvjetima: temperaturama od 30°C do 50°C, pH vrijednostima od 4 do 7 te pri početnim koncentracijama BPA od 50 mg dm⁻³ do 250 mg dm⁻³ *Pleurotus ostreatus* razgrađuje veći postotak BPA nego *Pleurotus pulmonarius*. *Pleurotus ostreatus* razgrađuje 100 % BPA (pri početnoj koncentraciji 50 mg dm⁻³) i 90 % pri početnoj koncentraciji BPA 100 mg dm⁻³ unutar 45 odnosno 30 minuta.⁵¹

Najveća razgradnja BPA *Pleurotus pulmonariuom* iznosi 80 % unutar 60 min, neovisno o početnoj koncentraciji BPA.⁵¹



Slika 2.6. *Pleurotus ostreatus*.⁵²

2.4.3. Biorazgradnja BPA algama

Zelena alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata* (slika 2.7.) može razgraditi BPA i ukloniti njegovu estrogensku aktivnost. *C.fusca* može ukloniti 85 % BPA za 120 h pod uvjetom da se nalazi na danjem svjetlu.²

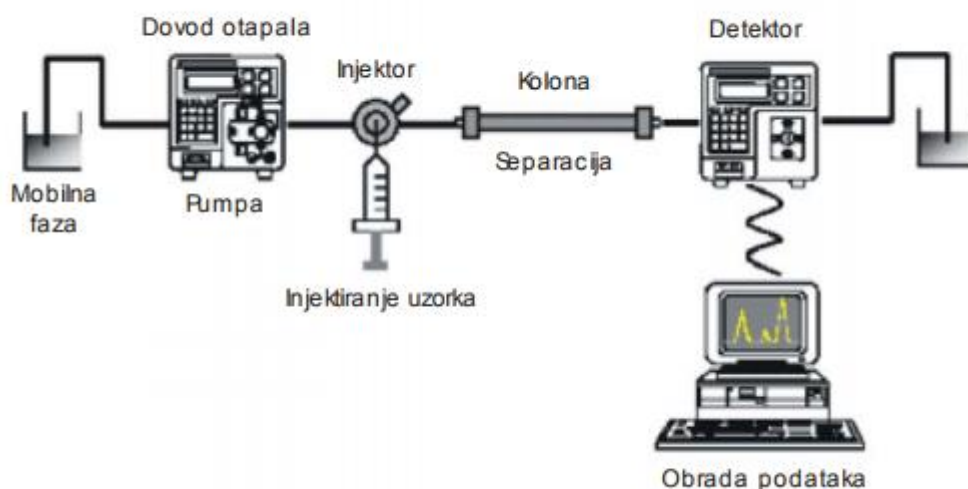


Slika 2.7. *Chlorella fusca* var. *Vacuolata*.⁵³

2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. **H**igh **p**erformance **l**iquid chromatography, HPLC) je suvremena analitička tehnika koja se razvila sredinom 1970.-ih, razvojem novih punila za kolone i vezanjem direktno na detektore. HPLC se koristi za razdvajanje komponenti smjese na osnovi kemijsko-fizikalnih interakcija između ispitivanog analita i tekuće pokretne faze i nepokretne faze u stupcu, a pogodna je za nisko hlapljive spojeve i spojeve nestabilne pri visokim temperaturama.⁵⁴ Pokretna faza je tekućina male viskoznosti dok je nepokretna faza najčešće fino usitnjena krutina s veličinom čestica 2-5 μm . S obzirom na polarnost nepokretne faze, razlikujemo kromatografiju normalnih i obratnih faza. Kromatografija normalnih faza koristi polarnu nepokretnu fazu (silikagel, alumijev oksid) dok je pokretna faza organsko otapalo. Kod kromatografije obratnih faza nepokretna faza je modificirani hidrofobni silikagel (nepolarni) dok je pokretna faza polarna.⁵⁵ Tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti karakteriziraju mali promjer čestica punila (3-50 μm), relativno visoki radni tlakovi, kontrolirani protok pokretne faze, mali promjer kolone, mogućnost višekratnog korištenja kolone, precizno injektiranje malih volumena uzorka, osjetljivi detektori za detekciju malih količina analita, automatizirani i standardizirani instrumenti, brza analiza te visoki stupanj razdvajanja.⁵⁴

Važnije komponente svakog uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su: spremnik pokretne faze, pumpa, injektor, kolona, detektor te računalo za prikaz podataka. Shema uređaja prikazana je na slici 2.8.



Slika 2.8. Shematski prikaz HPLC sustava.⁵⁴

Spremnik pokretne faze omogućuje skladištenje dovoljnog volumena otapala za kontinuirani rad sustava (minimalno 500 cm³). Cjevčica koja povezuje spremnik i crpku trebala bi imati filter kako bi se spriječilo unošenje čestica iz spremniku u crpku.

Pumpa omogućuje konstantan i kontinuiran protok pokretne faze kroz sustav. Budući da vrlo male čestice u kromatografskoj koloni pružaju otpor pokretnoj fazi potrebne su pumpe koje rade pri visokim tlakovima.

U HPLC sustavima se uobičajeno koriste pumpe s konstantnim protokom. Pokretna faza najčešće je kombinacija dva ili više otapala u različitom omjeru pa pumpe omogućuju njihovo kontrolirano miješanje. Injektor automatski unosi uzorak u struju pokretne faze prije samog ulaska u kromatografsku kolonu. Kromatografsku kolonu predstavlja metalna cijev unutar koje je smještena nepokretna faza. Dimenzije kromatografske kolone mogu biti različite: 100 – 250 mm duljine, 2,1 – 4,6 mm unutrašnjeg promjera te 3 – 5 µm promjera čestica. Detektor je zadnji dio uređaja, a služi za mjerenje promjena svojstava pokretne faze ili specifičnog svojstva analita.⁵⁴ Snimanje podataka izvršava se pomoću računalnog programa koji upravlja cijelim HPLC sustavom. On također i prikuplja te obrađuje dobivene podatke.⁵⁶

2.5.1. Razvoj metode

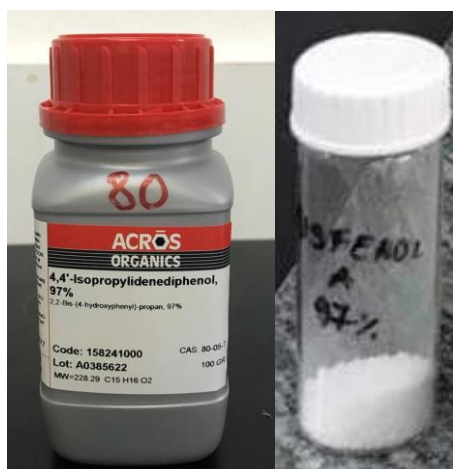
Razvoj metode u HPLC uključuje odabir mobilne faze, kolone, temperature i protoka kroz kolonu te detektora. Kod mobilne faze važan je udio vode i organske tvari, a pH mora biti stalan, što se postiže upotrebom pufera. Kod odabira kolone, potrebno je u obzir uzeti njenu duljinu, ukupnu širinu i promjer čestica punila. Što je kolona uža, to je osjetljivost manja, a spoj brže izlazi iz kolone, kod istog protoka. Za bolje razdvajanje koriste se veće kolone sa manjim česticama, ali tada spoj sporije izlazi. Odabir temperature kolone je bitan jer ona utječe na viskoznost pokretne faze. Povišena temperatura (30°C - 45°C) poboljšava difuznost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze, čime se poboljšavaju kinetički parametri i selektivnost. Brzina protoka pokretne faze kroz kolonu je također bitna jer utječe na vrijeme zadržavanja spoja u koloni. Što je protok pokretne faze veći, spoj brže izlazi, ali dobiveni pikovi su zbijeniji, što znači da je razdvajanje lošije i identifikacija je teža. Odabir detektora ovisi o prirodi uzorka koji se analizira. Važni su detektori spektrometar masa, spektrofotometrijski detektori u UV-VIS području elektromagnetskog zračenja, detektori na osnovi molekulske fluorescencije i indeksa loma te elektrokemijski detektori. Najčešće se koristi spektrofotometrijski UV/DAD detektori koji omogućavaju snimanje apsorpcijskih spektra u širokom rasponu valnih duljina.⁵⁵

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Bisfenol A

Korišten je bisfenol A čistoće 97 % proizvođača Acros Organics (slika 3.1.). Relativna molekulska masa spoja iznosi $228,29 \text{ g mol}^{-1}$. Standardna otopina pripremljena je otapanjem 15 mg praškastog BPA u 1 dm^3 MiliQ vode.



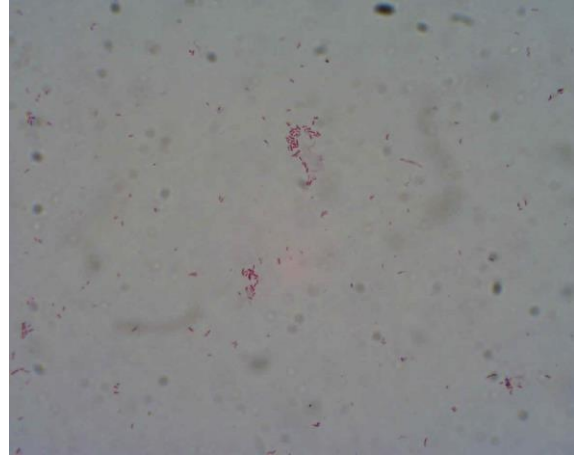
Slika 3.1. BPA u originalnoj ambalaži i u posudici.

3.1.2. Bakterijske kulture

Bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* BSW (3011), *Pseudomonas putida* (3014) i *Streptomyces* sp. (R7) koji su korišteni u eksperimentima pohranjeni su u zbirci mikroorganizama u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. izolirani su iz biootpada koji je korišten u procesu kompostiranja, a *Pseudomonas putida* iz aktivnog mulja.



(a)

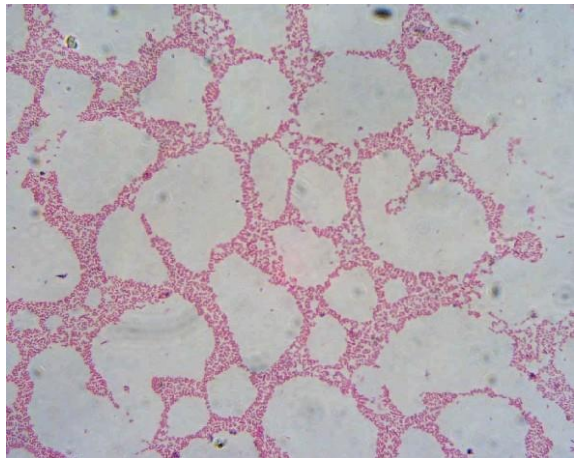


(b)

Slika 3.2. Bakterijska kultura *Pseudomonas aeruginosa* BSW na hranjivom agaru (a) i obojana po Gramu (b).

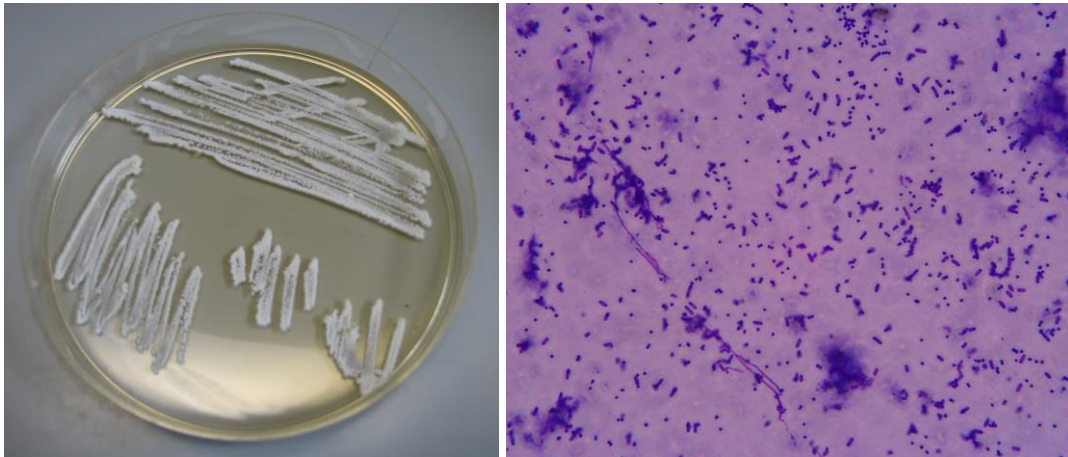


(a)



(b)

Slika 3.3. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* na hranjivom agaru (a) i obojana po Gramu (b).



(a)

(b)

Slika 3.4. Bakterijaska kultura *Streptomyces* sp. na hranjivom agaru (a) i obojana po Gramu (b).

3.2. Kemikalije i otopine

Kemikalije koje su korištene su čistoće p.a., proizvođača „KEMIKA“ Zagreb

- BPA čistoće 97 %
- MiliQ voda
- deionizirana voda s električnom provodnošću $\kappa < 1 \mu\text{S cm}^{-1}$
- otopina NaOH $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$
- otopina HCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$
- metanol
- izosan
- imerzijsko ulje

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj bakterija priređena je u Erlenmeyer tikvici prema uputama proizvođača (Biolife Manual, second edition, Ingraf, Italija 1991.). 4 g bujona i 8 g agara otopljeno je u 500 cm^3 deionizirane vode. Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 minuta u autoklavu pri $120 \text{ }^\circ\text{C}$ i 1,1 atm.

3.3. Instrumenti i aparatura

Za praćenje koncentracije kisika i pH vrijednosti korišten je prijenosni uređaj WTW Multi 3430 Multiparameter Meter (slika 3.5.).



Slika 3.5. Prijenosni WTW Multi 3430 Multiparameter Meter s elektrodama.

Pokusi su se provodili na tresilici Orbital Shaker PSU - 10i, Grant – bio (slika 3.6.) te na rotacijskoj tresilici Heidolph, Unimax 1010, Heidolph – Inkubator 1000, Njemačka (slika 3.7.).



Slika 3.6. Orbital Shaker PSU - 10i.



Slika 3.7. Heidolph, Unimax 1010.

- Optička gustoća određivala se spektrofotometrom HACH, DR2400, SAD (slika 3.8.).



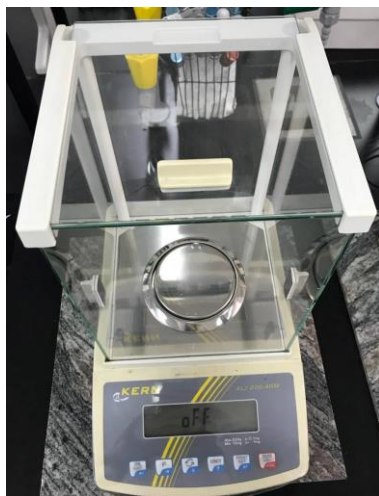
Slika 3.8. Spektrofotometar HACH, DR2400.

- Suspenzije su se homogenizirale homogenizatorom REAX top, Heidolph, Njemačka (slika 3.9.).



Slika 3.9. Homogenizator REAX top.

- Za vaganje se koristila analitička vaga KERN ALJ 220-4NM (slika 3.10.).



Slika 3.10. Analitička vaga KERN.

- Na uređaju HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU određivala se koncentracija bisfenola A. Uređaj (slika 3.11.) se nalazi u firmi CWT na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.



Slika 3.11. HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU.

- Za vlažnu sterilizaciju hranjivih podloga te čistog i nečistog staklenog posuđa korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija (slika 3.12.).



Slika 3.12. Autoklav Sutjeska.

- Za mikroskopiranje je korišten svjetlosni mikroskop Olympus BX50 (slika 3.13.).



Slika 3.13. Svjetlosni mikroskop Olympus BX50.

3.4. Analitički postupci

3.4.1. Razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tijekom eksperimenata u određenim vremenskim intervalima izuzimano je 500 μL uzorka i profiltrirano kroz filter, Chromafil xtra CA-45/25, promjera pora 0,45 μm , injektirano u vialu i analizirano na uređaju HPLC-MS, Shimadzu, Japan, koji je opremljen s UV-DAD, SPD-20 AV i LCMS 2020. Dvije pumpe korištene su za podešavanje protoka mobilne faze (0,1 % mravlje kiseline i 99 % metanola) koji je podešen na 0,3 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ i 0,2 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 μL . Intenzitet BPA mjereno je pri dvije valne duljine 220 nm i 254 nm te je maksimalna apsorpcija postignuta pri valnoj duljini 220 nm. Retencijsko vrijeme BPA bilo je u 4 minuti. Kromatografske analize provedene su na koloni Phenomenex Gemini 3u C18 110A (150 \times 4,6 mm) koja je bila termostatorirana na temperaturi od 40 $^{\circ}\text{C}$.

Nakon razvoja metode pripremile su se različite masene koncentracije bisfenola A u rasponu od 0,5 do 15 mg dm^{-3} (tablica 3.1.) te se svaka koncentracija izmjerila tri puta kako bi se snimio baždarni dijagram.

Tablica 3.1. Priprema otopina BPA različitih koncentracija za izradu baždarnog dijagrama.

Otopina	$\gamma / \text{mg dm}^{-3}$	$V (\text{otopina}) / \text{cm}^3$
1	0,5	25,0
2	1,0	
3	2,5	
4	5,0	
5	7,5	
6	10,0	
7	15,0	

Koncentracija BPA tijekom eksperimenta pratila se navedenom metodom tako što se u određenim vremenskim intervalima uzimalo 0,5 cm^3 uzorka poluautomatskom pipetom sa sterilnim nastavkom, filtriralo kroz 0,45 membranski filter (slika 3.14.) u vijale (slika 3.15.) i zatim nosilo na HPLC analizu.



Slika 3.14. Membranski filter sa injekcijama.



Slika 3.15. Viale.

3.4.2. Određivanje pH-vrijednosti i koncentracije kisika

Eksperiment se provodio dva sata i u tom periodu se pratila promjena pH-vrijednosti pomoću vodikove elektrode spojene na multimeter dok se koncentracija kisika u uzorku pratila kisikovom elektrodom također spojenom na multimeter. Elektrode su se uranjale u tikvice s uzorcima te bi se pričekalo nekoliko sekundi dok se mjerene vrijednosti ne ustale.

3.4.3. Određivanje optičke gustoće

Optička gustoća određivala se pri $\lambda = 600 \text{ nm}^{57}$ na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, USA. Kao slijepa proba koristila se deionizirana voda, volumena 5 cm^3 . U vremenu trajanja eksperimenta od dva sata uzimalo se $0,5 \text{ cm}^3$ suspenzije i razrjeđivalo se sa $4,5 \text{ cm}^3$ deionizirane vode, odnosno uzorak je bio razrijeđen 10 puta.

3.4.4. Bojanje bakterija po Gramu

Prije samog bojanja bakterijskih stanica po Gramu, pripremljen je trajni preparat u sterilnim uvjetima rada. Predmetnica se odmastila čistom staničevinom te se u sredinu predmetnice nanijela kap vode. Sa čvrste podloge mikrobiološkom ušicom preneseno je malo bakterijske kulture u kap vode i razvučeno u tankom sloju po površini predmetnice. Preparat se sušio na zraku nakon čega se fiksirao tako da se predmetnica povukla preko blagog ili svjetlećeg plamena tri puta. Da bi se preparat obojao prema Gramu na njega je dodano nekoliko kapi kristal violet boje koja je stajala na preparatu 3 minute.

Primarno bojilo obojalo je sve stanice plavo – ljubičasto. Zatim se preko čitavog preparata nanijela Lugolova otopina koja je stajala na preparatu također 3 minute. Nakon Lugolove otopine preparat se ispirao s etanolom 30 sekundi, a zatim s deioniziranom vodom. Gram pozitivne bakterije su ostale modre, a gram negativne su se obojale u crveno kontrastnim bojilom safraninom koje je stajalo jednu minutu. Preparat se ponovno isprao deioniziranom vodom i posušio papirom za upijanje kako bi bio spreman za mikroskopiranje.

3.4.5. Priprema vlažnog preparata i mikroskopiranje bakterija

Za mikroskopiranje bakterija pripremljen je vlažni preparat u sterilnim uvjetima rada. Kulture su prethodno uzgojene na hranjivom agaru. Prije same pripreme vlažnog preparata upaljen je plamenik, koji je gorio tijekom cijele pripreme preparata, te je namješten šušteći (oksidirajući) plamen i dezinficirana je radna površina izosanom. Predmetnica se očistila čistom staničevinom (krpicom), kako bi se uklonile nečistoće, nakon čega se odložila blizu plamenika te se na nju kapnula mala količina deionizirane vode. Mikrobiološka ušica se sterilizirala u plamenu pod kutom od 45°, a zatim se pomoću iste te sterilne i ohlađene mikrobiološke ušice ostrugao dio bakterijske kulture sa hranjive podloge. Uzorak se prenio u kap vode te se homogenizirao. Ušica se po završetku radnje sterilizirala i odložila na stalak. Preparat se pokrio pokrovnicom, a zaostali zrak se istisnuo. Pripremljeni vlažni preparat se mikroskopirao.

Prije početka mikroskopiranja su se staničevinom (krpicom) dobro obrisali svi optički dijelovi mikroskopa. Nakon toga se uključio mikroskop, stolić mikroskopa se maksimalno spustio i na njega se odložio i pričvrstio preparat. Na preparat se kapnula kapljica imerzijskog ulja^j. Na revolveru je odabran objektiv sa najvećim povećanjem (100x) te gledajući sa strane u frontalnu leću objektiva, makrovijkom se podignuo stolić mikroskopa dok se leća u potpunosti nije uronila u imerzijsko ulje i dodirnula preparat. Gledajući kroz okular, uz pomoć makrovijka tražila se mikroskopska slika. Pronađena slika se izoštrila pomoću mikrovijka.

Po završetku mikroskopiranja su svi dijelovi mikroskopa vraćeni u početni položaj te su staničevinom očišćeni objektiv i okular.

^j Imerzijsko ulje se koristi pri velikim povećanjima jer ima indeks refrakcije blizu indeksa refrakcije stakla. ⁵⁸

3.5. Postupci provedenih ispitivanja

3.5.1. Priprava suspenzija bakterija

Dan prije postavljanja pokusa potrebno je bakterije *Pseudomonas aeruginosa* BSW, *Pseudomonas putida* i *Streptomyces* sp. uzgojiti na hranjivom agaru u Petrijevim zdjelicama. Sterilnom ušicom je ostrugan mali dio bakterijske kulture sa Petrijeve zdjelice i tehnikom iscrpljivanja^k precijepjen je na drugu Petrijevu zdjelicu. Kulture su ostavljene na inkubaciji na temperaturi od 28°C *Streptomyces* sp., te 37°C *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida*.

Neposredno prije postavljanja pokusa pripremila se suspenzija određene bakterijske kulture zadane početne optičke gustoće (*Streptomyces* sp., *Pseudomonas aeruginosa* BSW ili *Pseudomonas putida*) u sterilnim uvjetima rada. U Petrijevu zdjelicu se izlila MiliQ voda, a zatim se Pasteur pipetom oprezno sastrugala uzgojena bakterijska kultura i prenijela u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu.

3.5.2. Biorazgradnja BPA s različitim bakterijskim kulturama

U pokusu P1 provodila se biorazgradnja bisfenola A s bakterijskim kulturama *Streptomyces* sp., *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* pri temperaturi od 25°C, te početnim uvjetima prikazanim u tablici 3.2. U ovom pokusu korištene su bakterijske kulture koje nisu prethodno prilagođene na BPA te koje jesu prilagođene u cilju ubrzanja procesa biorazgradnje. Prilagodba bakterijskih kultura se provodila tako što se u hranjivi agar stavila određena koncentracija BPA (15 mg dm⁻³) i precijepile su se navedene bakterijske kulture. U sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama od 100 cm³ pripremljeno je 50 cm³ uzorka koji se sastojao od sterilne otopine BPA i suspenzije određene bakterijske kulture (prilagođena i neprilagođena bakterijska kultura). Tikvice su postavljene na rotacijsku tresilicu i miješale su se pri 160 okretaja u minuti 48 sati. U određenim vremenskim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika. Na temelju dobivenih rezultata kreirao se daljnji tijek pokusa, odnosno odlučilo se s kojim bakterijskim kulturama će se dalje provoditi biorazgradnja BPA.

^k Petrijeva zdjelica u koju se prenosi materijal se obuhvati vrhovima prstiju. Ušicom lagano dodirivajući hranjivu podlogu prenosi se materijal s ušice na hranjivu podlogu pritom pazeći da se ne izreže hranjiva podloga. ⁵⁹

Tablica 3.2. Provedba pokusa P1.

Pokus	Bakterijska kultura	V (otopine) / cm ³	Optička gustoća _{600nm} /-	γ (BPA) / mg dm ⁻³	pH-vrijednost /-
P1-1	<i>Streptomyces</i> sp.	50	0,2	6	6,2
P1-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BSW				
P1-3	<i>Pseudomonas putida</i>				

3.5.3. Utjecaj pH vrijednosti na biorazgradnju BPA

U pokusima P2 (P2-1 do P2-3) i P3 (P3-1 do P3-3) ispitao se utjecaj pH-vrijednosti na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyces* sp. (P2) i *Pseudomonas aeruginosa* BSW (P3). Početni uvjeti procesa dani su u tablici 3.3. Svi pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min i pri temperaturi od 25 °C tijekom četiri sata. pH- vrijednost otopina namjestila se dodatkom otopina 0,1 mol dm⁻³ NaOH, i 0,1 mol dm⁻³ HCl. U određenim vremenskim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

Tablica 3.3. Provedba pokusa P2 i P3.

Pokus	Bakterijska kultura	V (otopine) / cm ³	Optička gustoća _{600nm} /-	γ (BPA) / mg dm ⁻³	pH-vrijednost /-
P2-1	<i>Streptomyces</i> sp.	50	0,2	15	5,40
P2-2					6,29
P2-3					7,30
P3-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BSW				5,40
P3-2					6,29
P3-3					7,30

3.5.4. Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA

U pokusima P4 (P4-1 do P4-3) i P5 (P5-1 do P5-3) ispitaio se utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyces* sp. (P4) i *Pseudomonas aeruginosa* (P5). Početni uvjeti procesa dani su u tablici 3.4. Svi pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min i pri temperaturi od 25 °C tijekom četiri sata. U određenim vremenskim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

Tablica 3.4. Provedba pokusa P4 i P5.

Pokus	Bakterijska kultura	V (otopine) / cm ³	pH - vrijednost /-	γ (BPA) / mg dm ⁻³	Optička gustoća _{600nm} /-
P4-1	<i>Streptomyces</i> sp.	50	6,29	15	0,13
P4-2					0,25
P4-3					0,36
P5-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BSW				0,09
P5-2					0,24
P5-3					0,35

3.5.5. Utjecaj koncentracije BPA na biorazgradnju BPA

U pokusima P6 (P6-1 do P6-6) i P7 (P7-1 do P7-6) ispitaio se utjecaj početne koncentracije BPA na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyces* sp. (P6) i *Pseudomonas aeruginosa* BSW (P7). Početni uvjeti procesa dani su u tablici 3.5. Svi pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min i pri temperaturi od 25 °C tijekom četiri sata. U određenim vremenskim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

Tablica 3.5. Provedba pokusa P6 i P7.

Pokus	Bakterijska kultura	V (otopine) / cm ³	pH - vrijednost /-	Optička gustoća _{600nm} /-	γ (BPA) / mg dm ⁻³
P6-1	<i>Streptomyces</i> sp.	50	6,29	0,2	1
P6-2					2,5
P6-3					5
P6-4					7,5
P6-5					12
P6-6					15
P7-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BSW	50	6,29	0,2	1
P7-2					2,5
P7-3					5
P7-4					7,5
P7-5					12
P7-6					15

3.5.6. Utjecaj temperature na biorazgradnju BPA

U pokusima P8 (P8-1 do P8-3) i P9 (P9-1 do P9-3) ispitalo se utjecaj početne temperature na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyces* sp. (P8) i *Pseudomonas aeruginosa* BSW (P9). Početni uvjeti procesa dani su u tablici 3.6. Svi pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min i pri pH-vrijednosti 6,29 tijekom četiri sata. U određenim vremenskim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

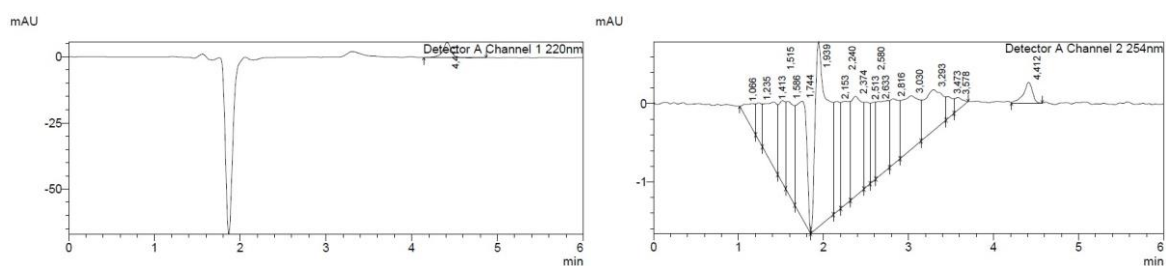
Tablica 3.6. Provedba pokusa P8 i P9.

Pokus	Bakterijska kultura	V (otopine) / cm ³	γ (BPA) / mg dm ⁻³	Optička gustoća _{600nm} /-	T / °C
P8-1	<i>Streptomyces</i> sp.	50	15	0,2	25
P8-2					35
P8-3					40
P9-1	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> BSW				25
P9-2					35
P9-3					40

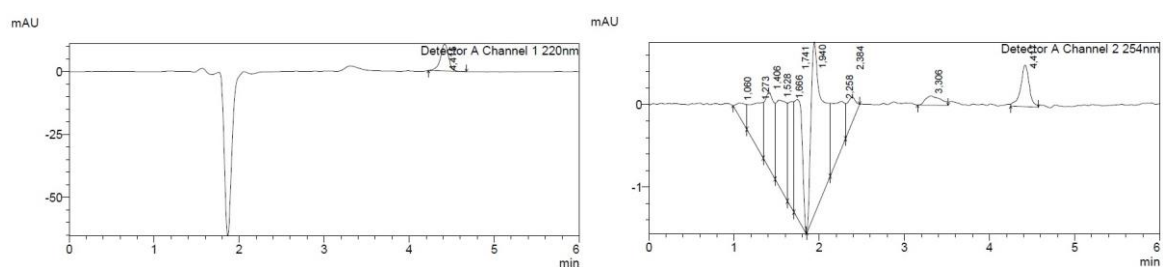
4. REZULTATI

4.1. Razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

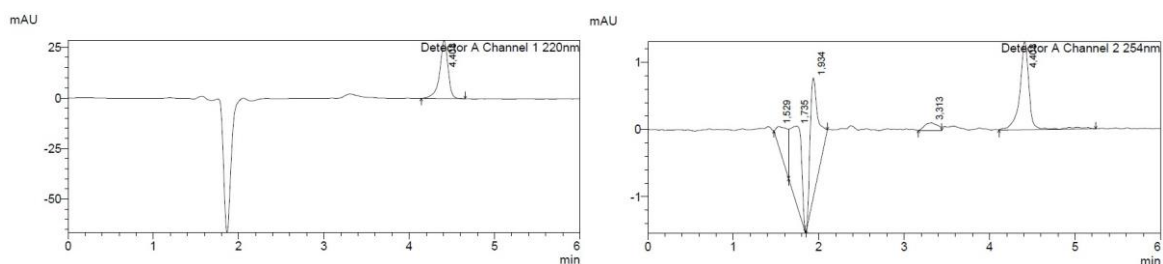
Na slici 4.1. prikazani su dobiveni kromatogrami za BPA pri zadanim uvjetima za razvoj metode na HPLC-u opisanim u poglavlju 3.4.1., a u slici 4.2. baždarni pravac za BPA.



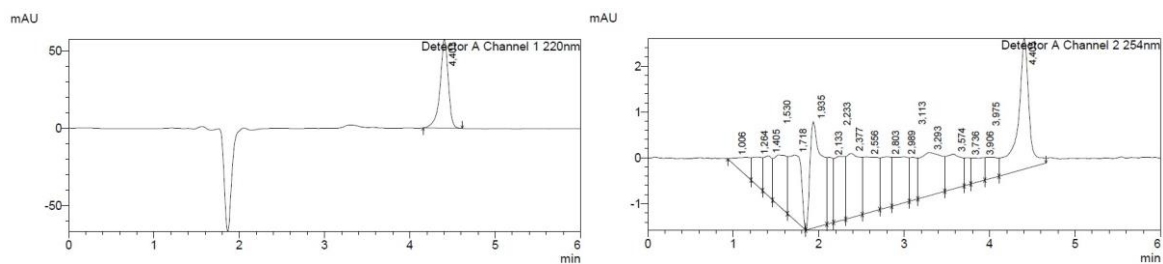
(a)



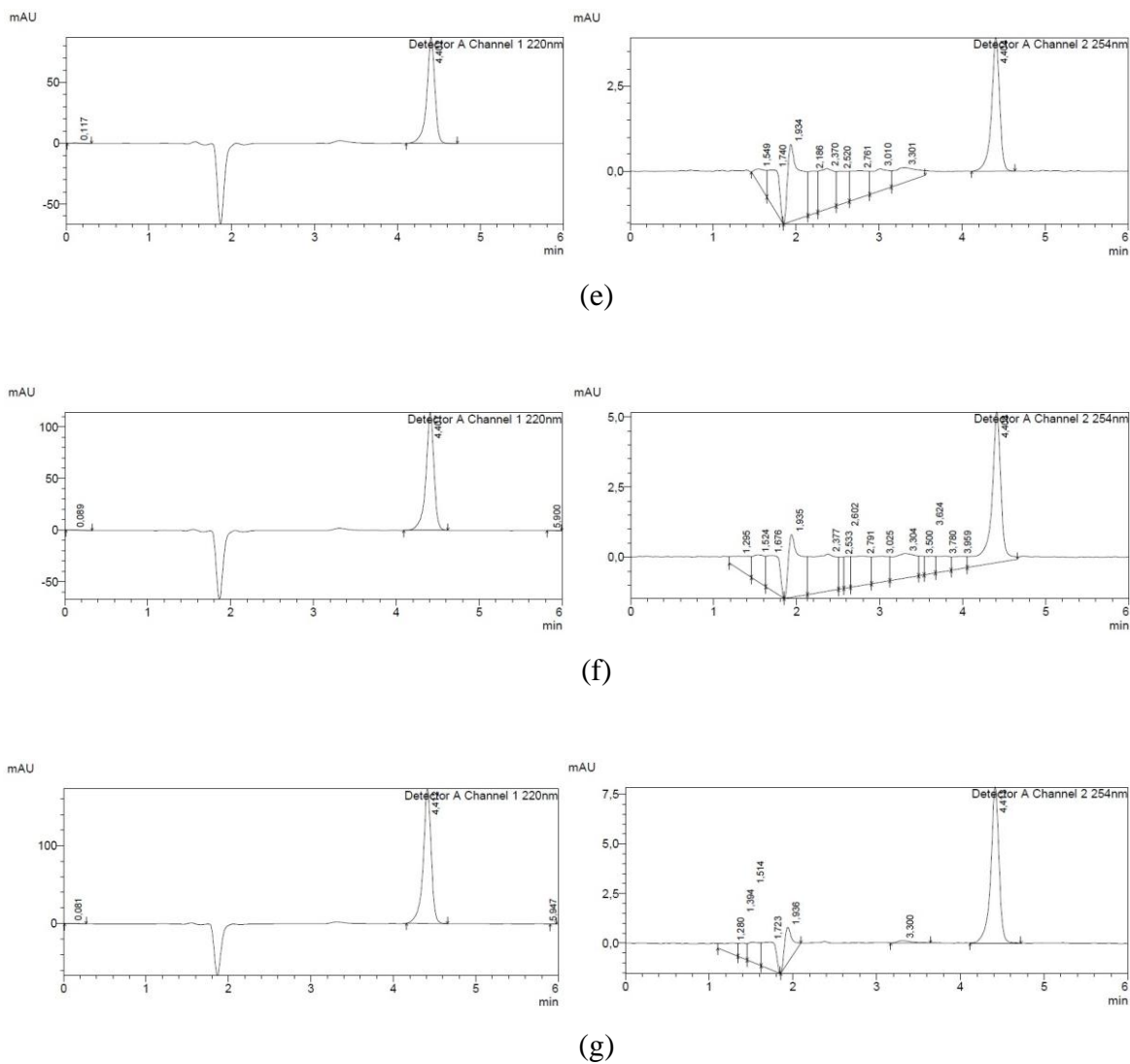
(b)



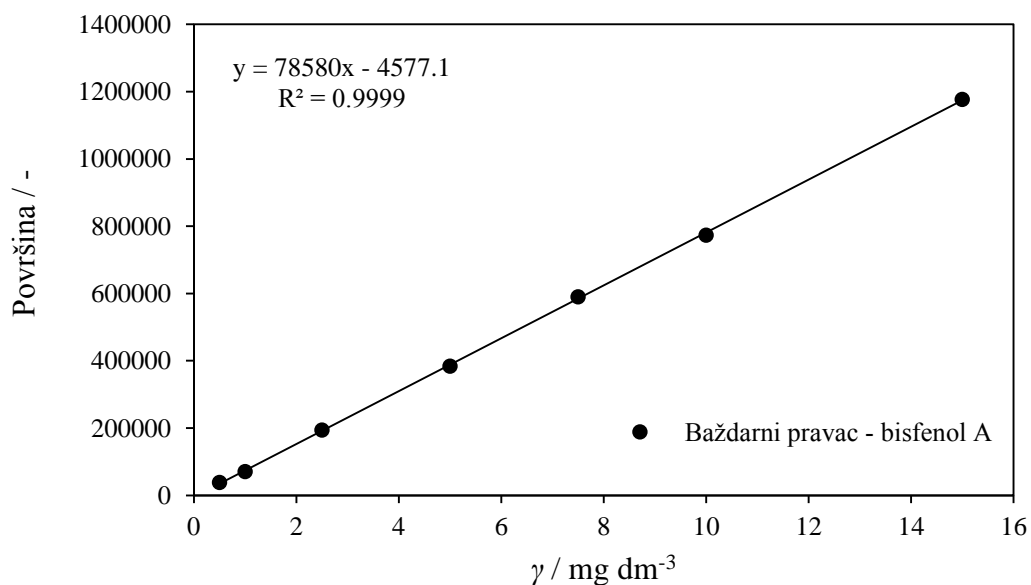
(c)



(d)



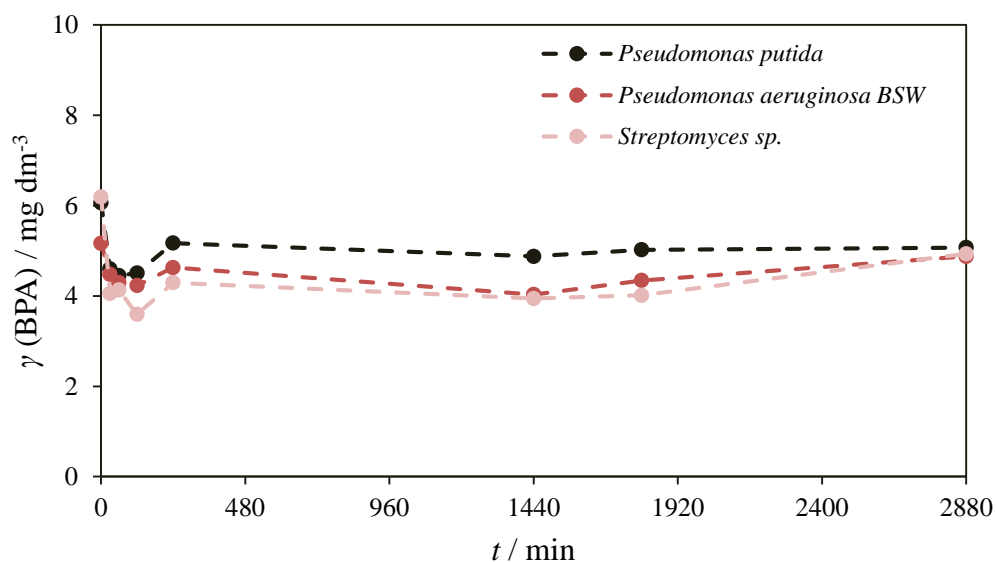
Slika 4.1. Kromatografski spektri pri određenim koncentracijama BPA i valnim duljinama 220 nm i 254 nm: $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ (a), $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ (b), 2 mg dm^{-3} (c), 5 mg dm^{-3} (d), $7,5 \text{ mg dm}^{-3}$ (e), 10 mg dm^{-3} (f), 15 mg dm^{-3} (g).



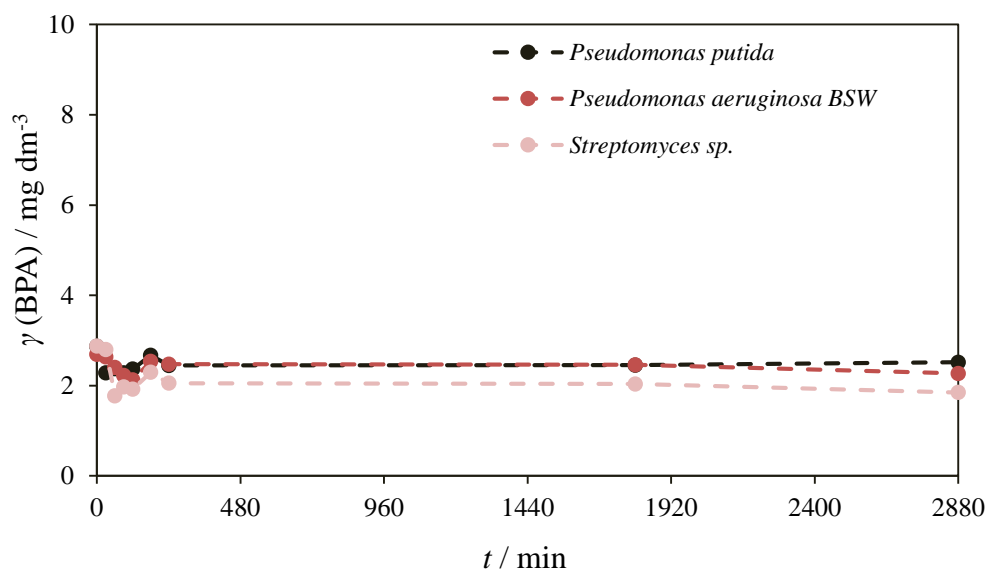
Slika 4.2. Baždarni dijagram za BPA.

4.2. Biorazgradnja BPA s različitim kulturama

U slikama 4.3. i 4.4. prikazana je biorazgradnja BPA s različitim neprilagođenim i prilagođenim bakterijskim kulturama tijekom 48 h, tablica 3.2.



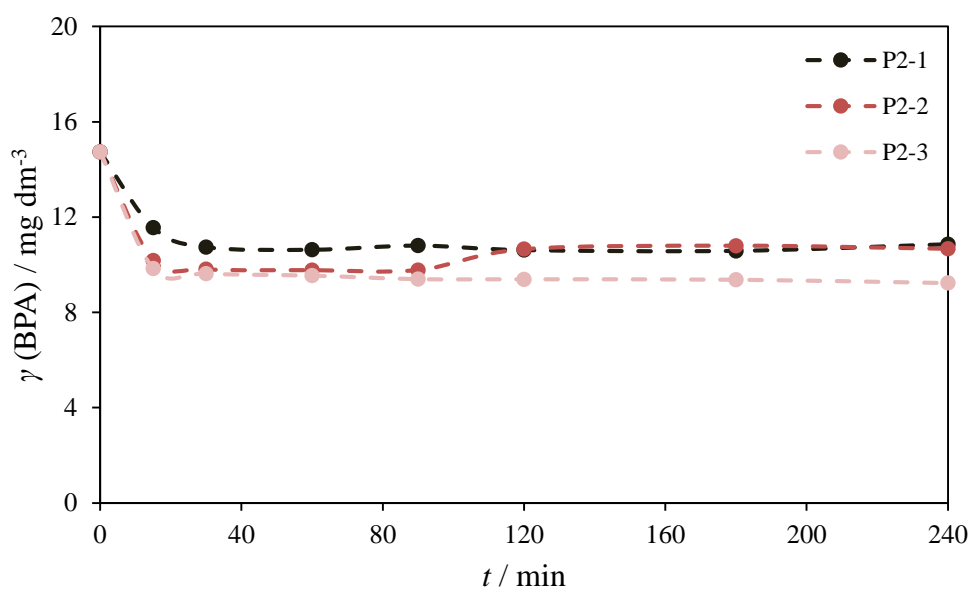
Slika 4.3. Promjena koncentracije BPA tijekom 48 sati u pokusu P1 (neprilagođene kulture).



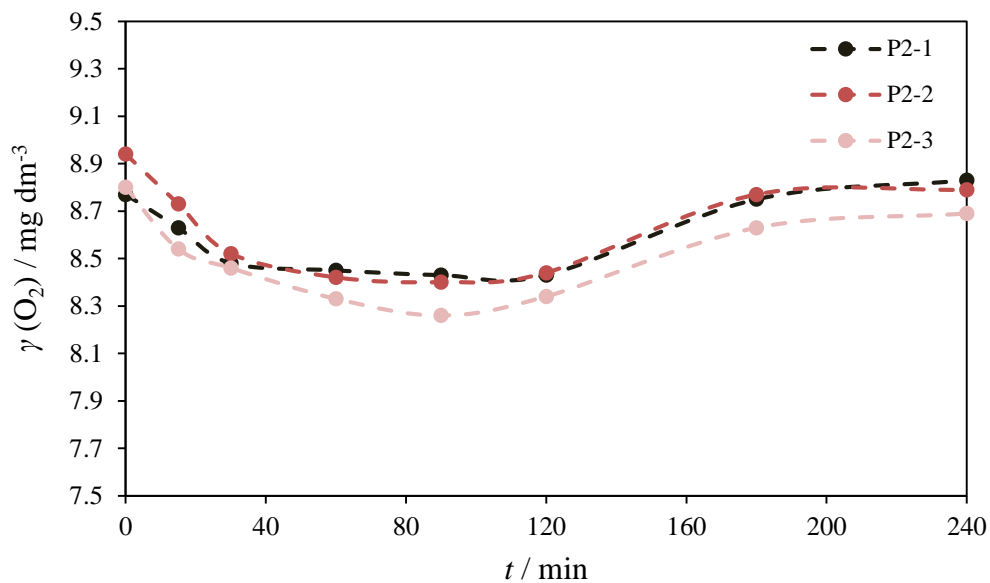
Slika 4.4. Promjena koncentracije BPA tijekom 48 sati u pokusu P1 (prilagođene kulture).

4.3. Utjecaj pH-vrijednosti na biorazgradnju BPA

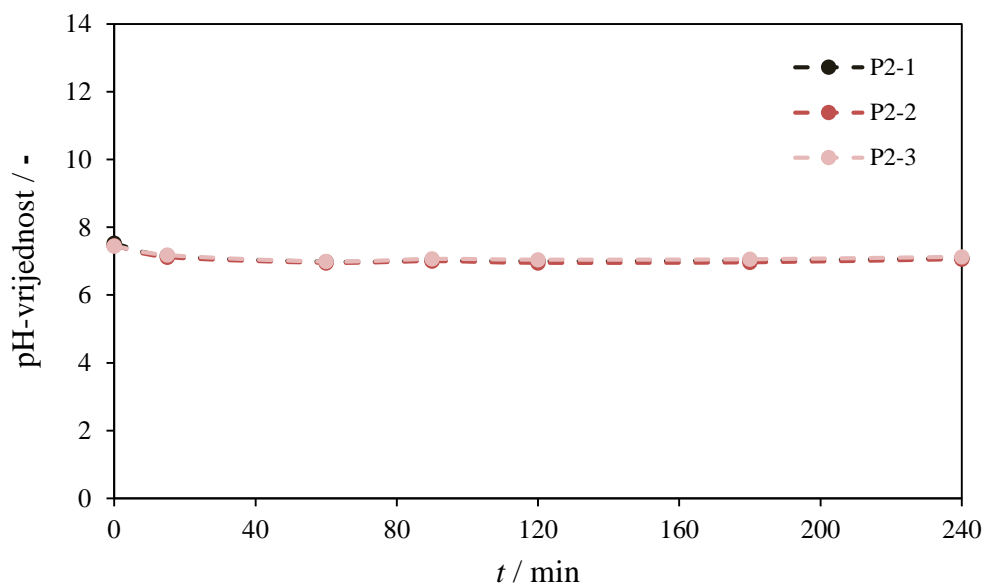
U ovom poglavlju prikazani su rezultati pokusa P2 i P3. Proces biorazgradnje provodio se prema uvjetima danim u tablici 3.3. Rezultati provedbe pokusa P2 (*Streptomyces* sp.) prikazani su u slikama 4.5., 4.6. i 4.7., a rezultati pokusa P3 (*Pseudomonas aeruginosa* BSW) u slikama 4.8, 4.9. i 4.10.



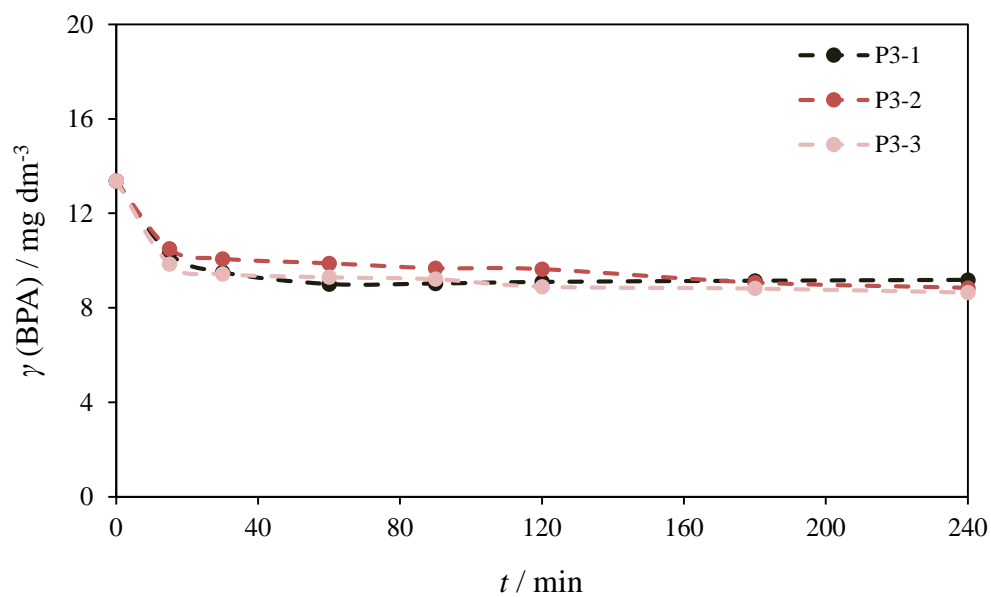
Slika 4.5. Promjena koncentracije BPA tijekom četiri sata u pokusu P2.



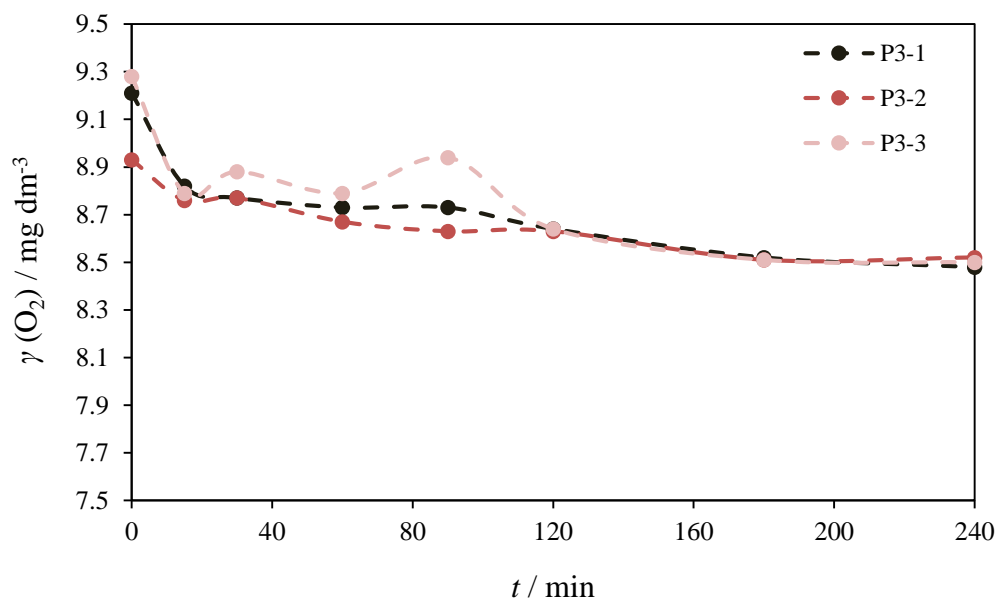
Slika 4.6. Promjena koncentracije kisika tijekom četiri sata u pokusu P2.



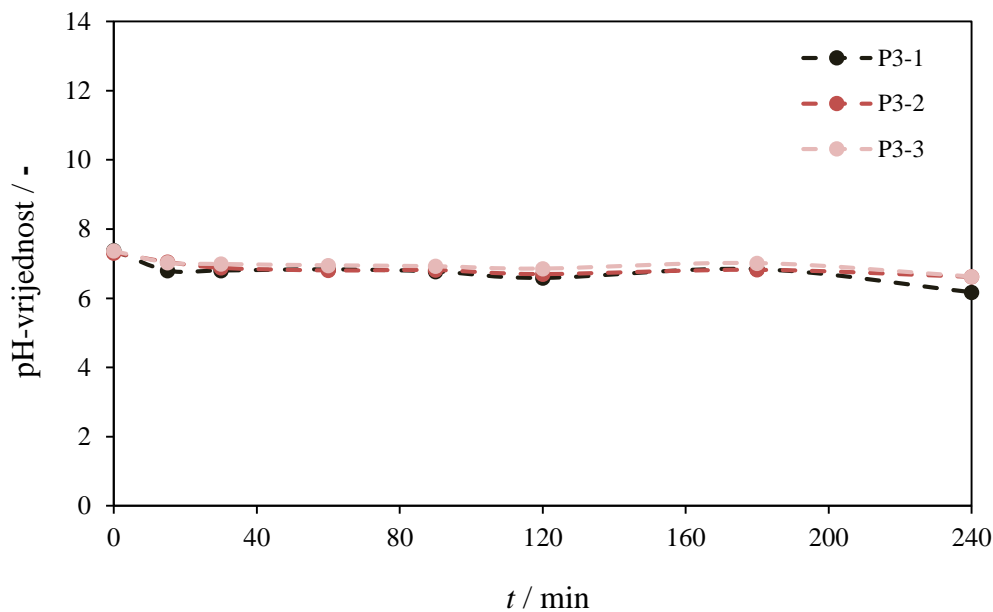
Slika 4.7. Promjena pH-vrijednosti tijekom četiri sata u pokusu P2.



Slika 4.8. Promjena koncentracije BPA tijekom četiri sata u pokusu P3.



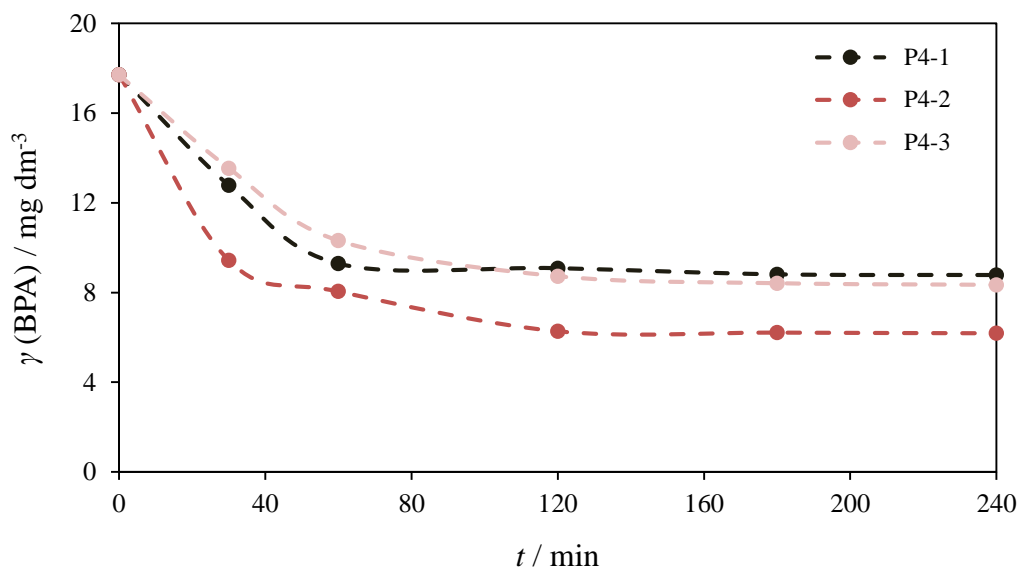
Slika 4.9. Promjena koncentracije kisika tijekom četiri sata u pokusu P3.



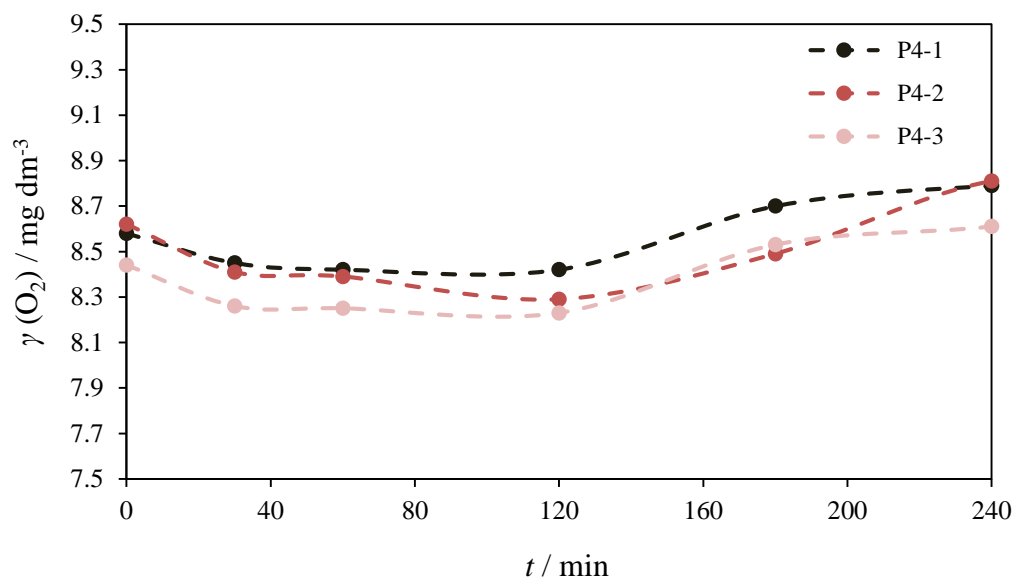
Slika 4.10. Promjena pH vrijednosti tijekom četiri sata u pokusu P3.

4.4. Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA

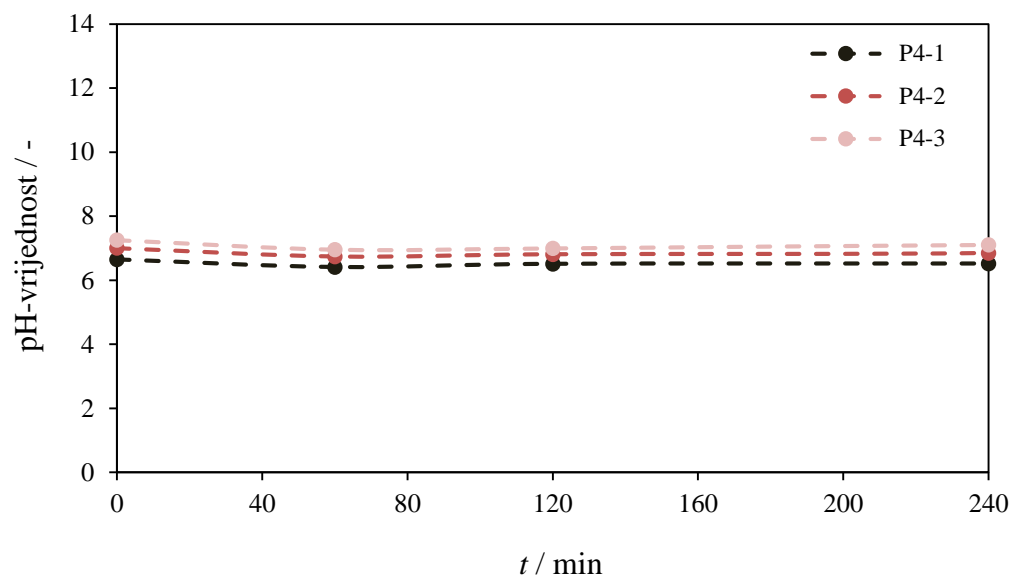
U ovom poglavlju prikazani su rezultati pokusa P4 i P5. Proces biorazgradnje provodio se prema uvjetima danim u tablici 3.4. Rezultati provedbe pokusa P4 (*Streptomyces* sp.) prikazani su u slikama 4.11., 4.12. i 4.13, a rezultati pokusa P5 (*Pseudomonas aeruginosa* BSW) u slikama 4.14., 4.15. i 4.16.



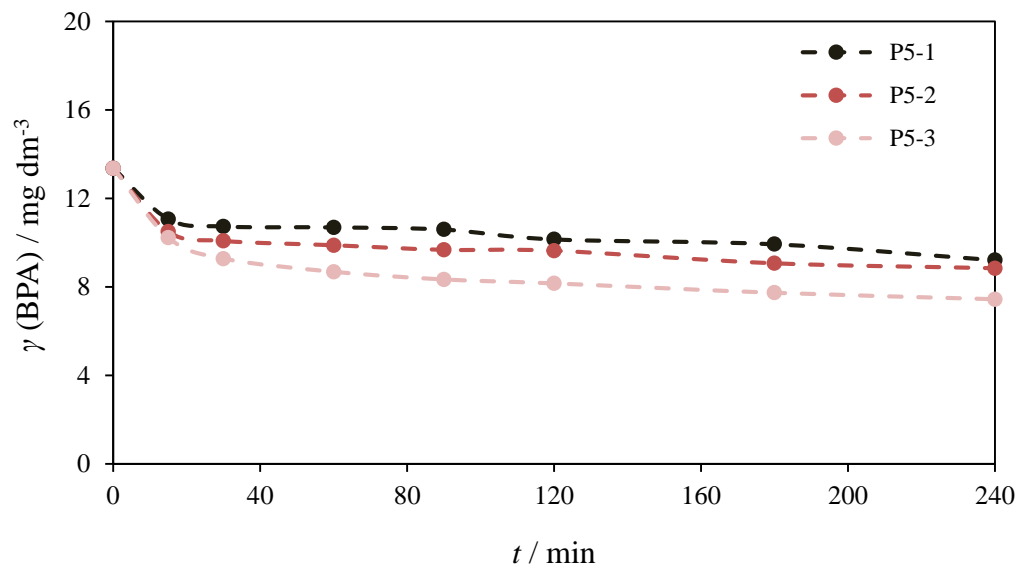
Slika 4.11. Promjena koncentracije BPA tijekom četiri sata u pokusu P4.



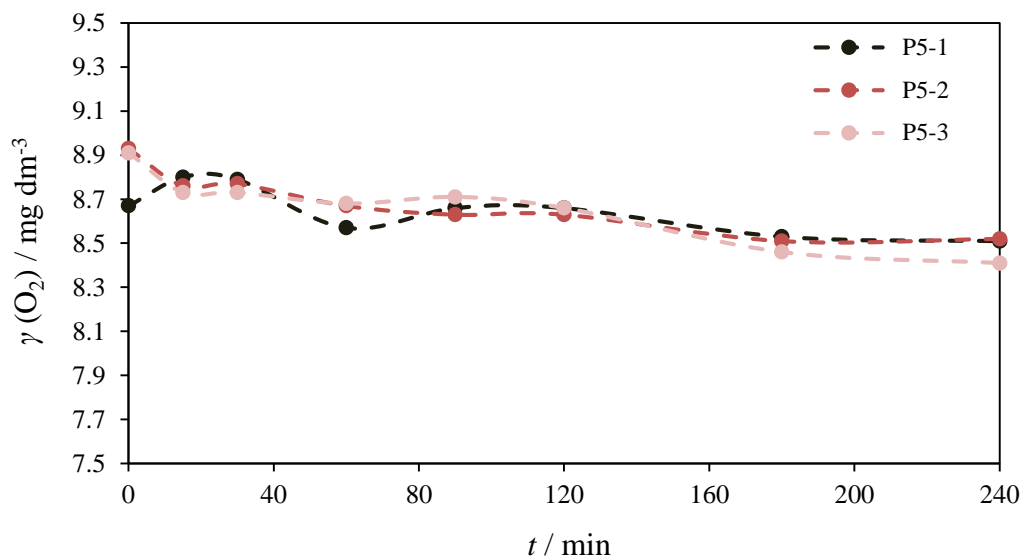
Slika 4.12. Promjena koncentracije kisika tijekom četiri sata u pokusu P4.



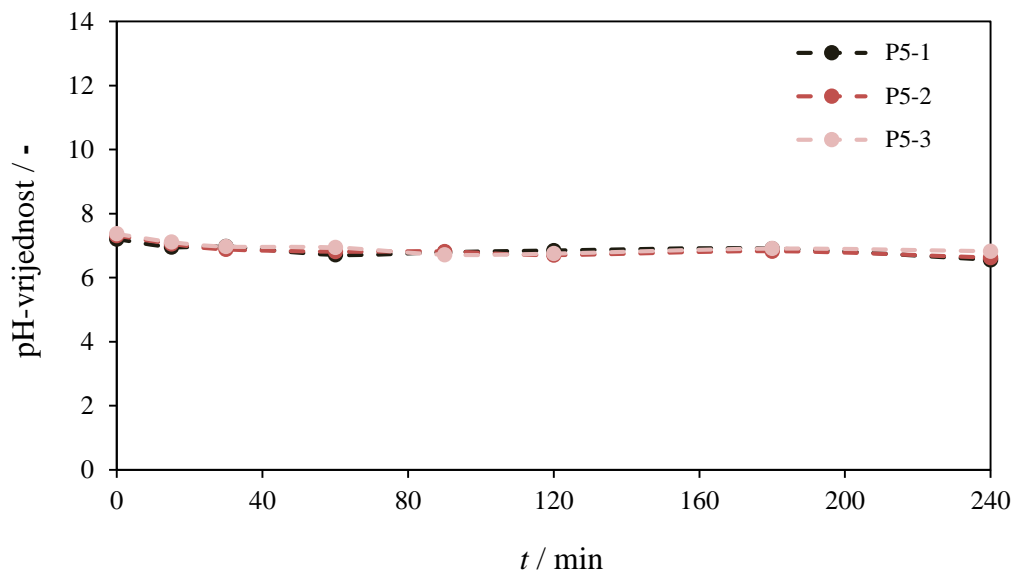
Slika 4.13. Promjena pH-vrijednosti tijekom četiri sata u pokusu P4.



Slika 4.14. Promjena koncentracije BPA tijekom četiri sata u pokusu P5.



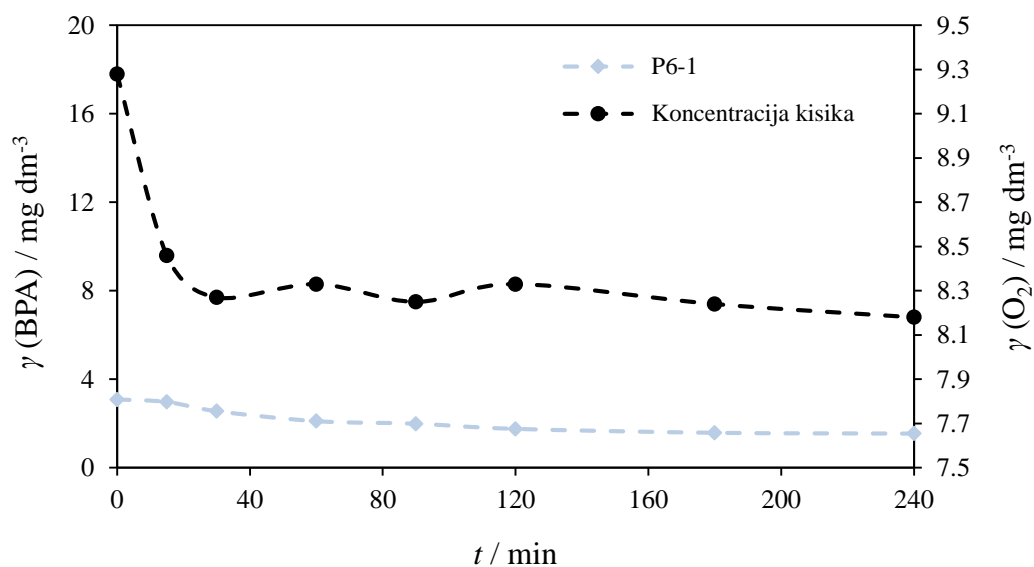
Slika 4.15. Promjena koncentracije kisika tijekom četiri sata u pokusu P5.



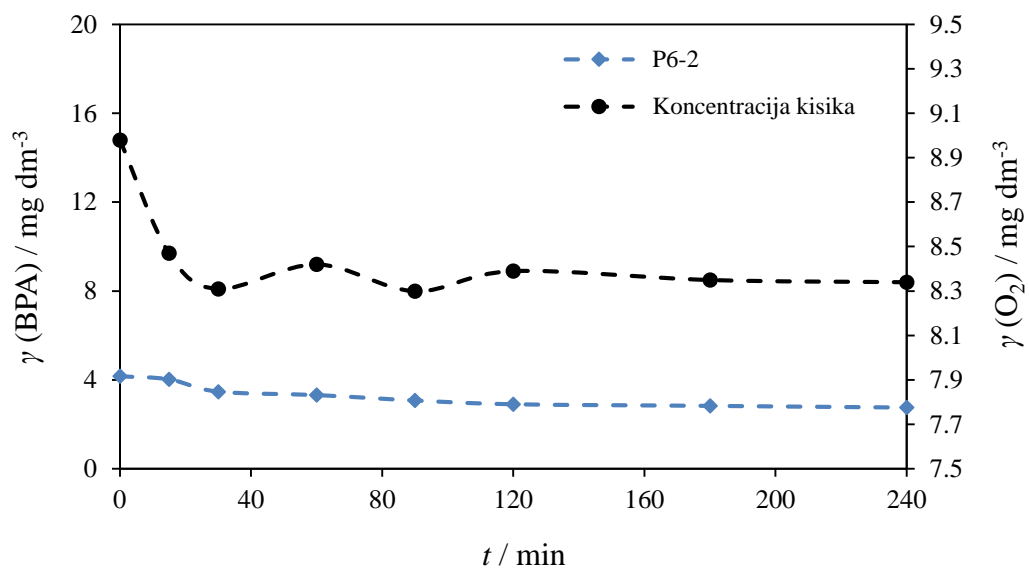
Slika 4.16. Promjena pH-vrijednosti tijekom četiri sata u pokusu P5.

4.5. Utjecaj koncentracije BPA na biorazgradnju BPA

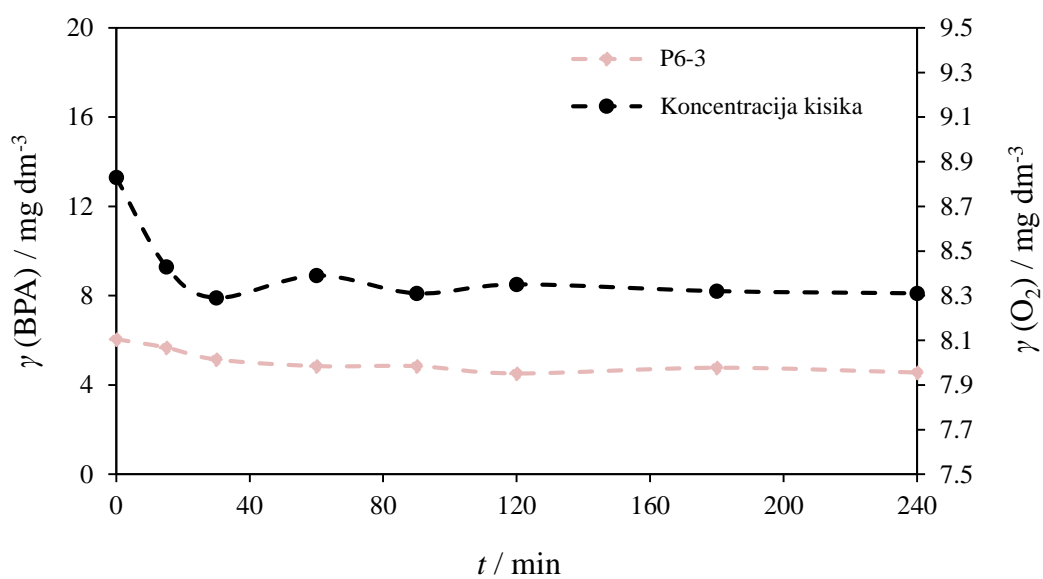
U ovom poglavlju prikazani su rezultati pokusa P6 i P7. Proces biorazgradnje provodio se prema uvjetima danim u tablici 3.5. Rezultati provedbe pokusa P6 (*Streptomyces* sp.) prikazani su u slikama od 4.17. do 4.23, a rezultati pokusa P7 (*Pseudomonas aeruginosa* BSW) u slikama od 4.24 do 4.30.



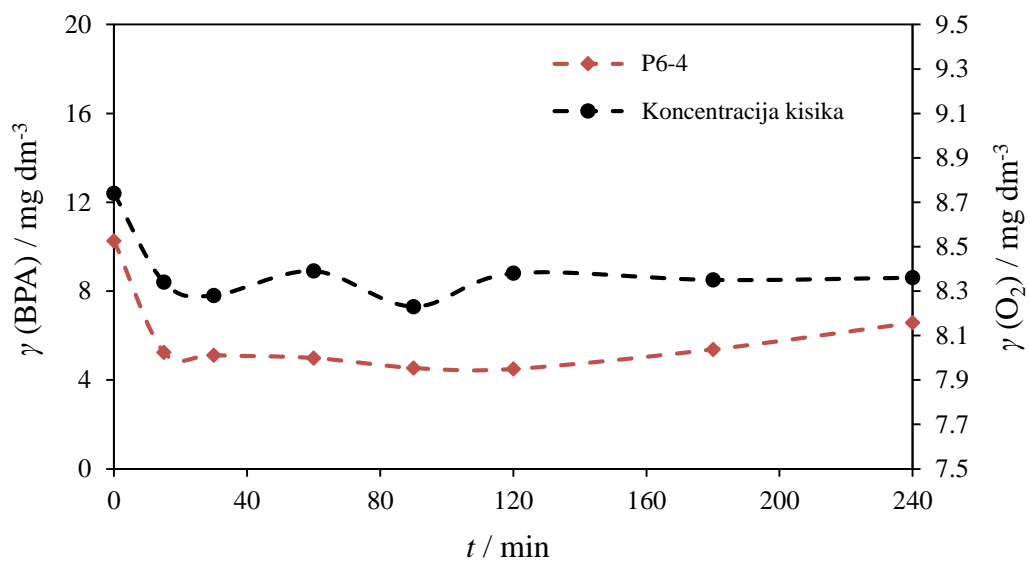
Slika 4.17. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P6 – 1.



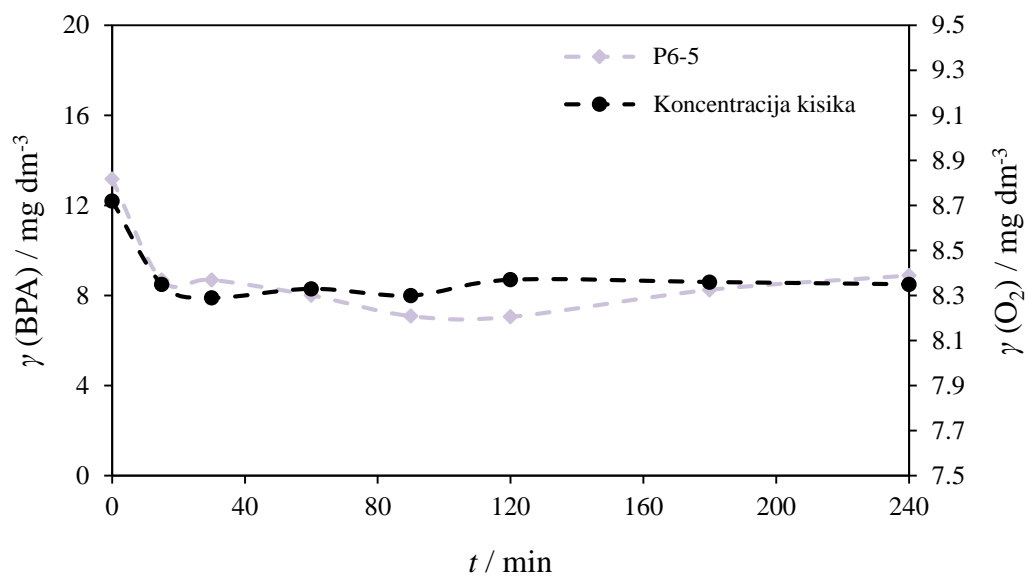
Slika 4.18. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P6 – 2.



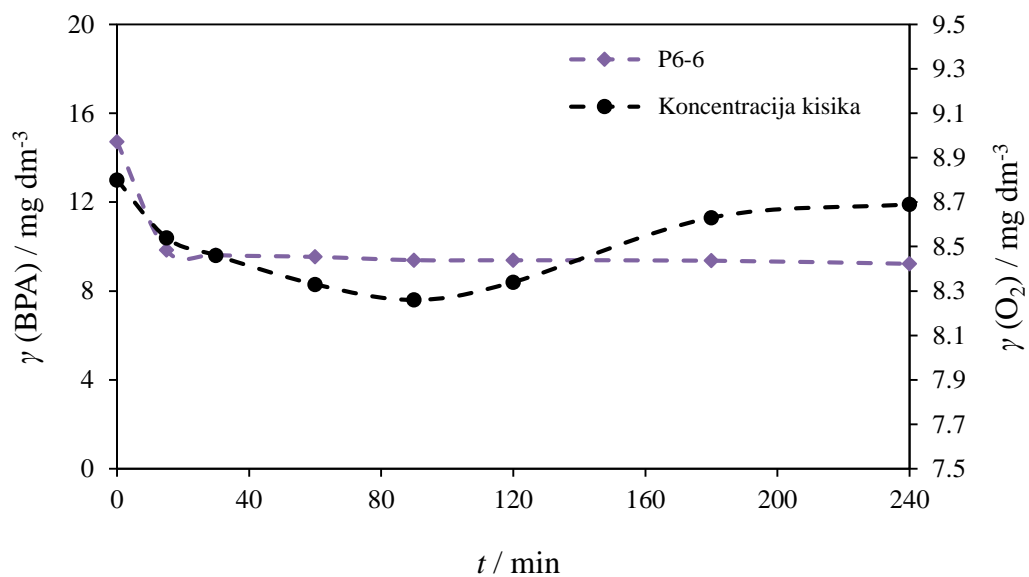
Slika 4.19. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P6 – 3.



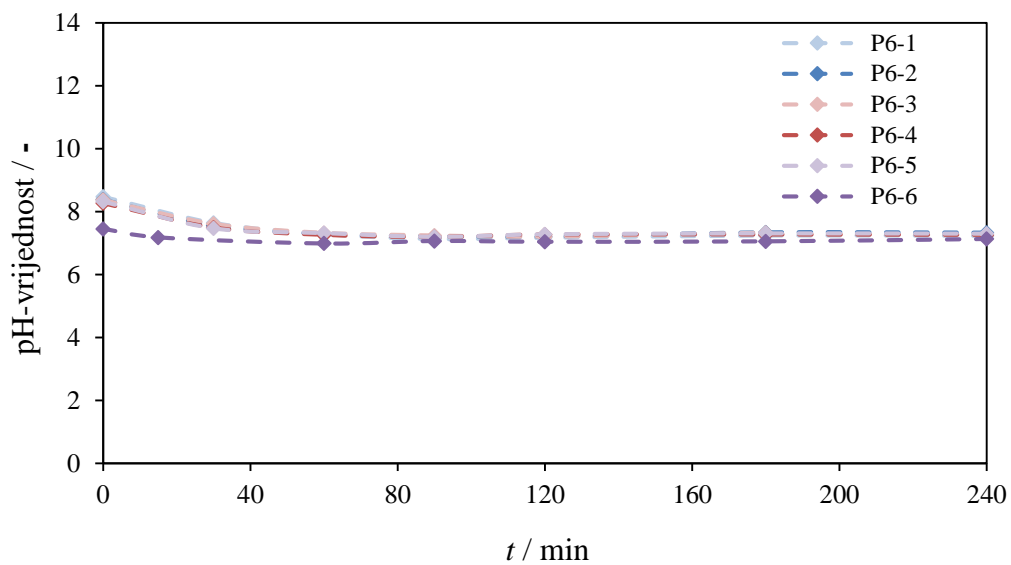
Slika 4.20. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P6 – 4.



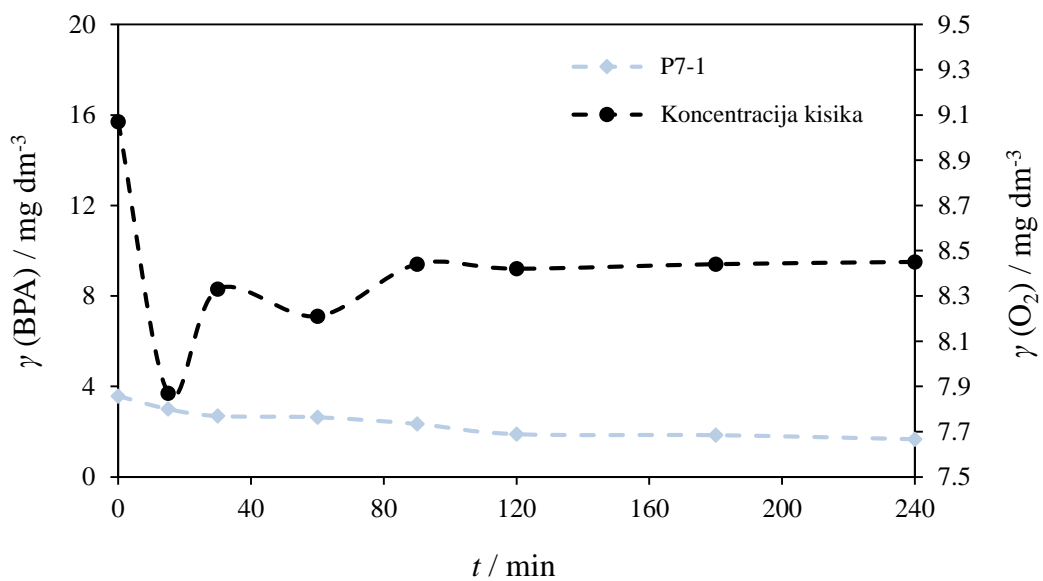
Slika 4.21. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P6 – 5.



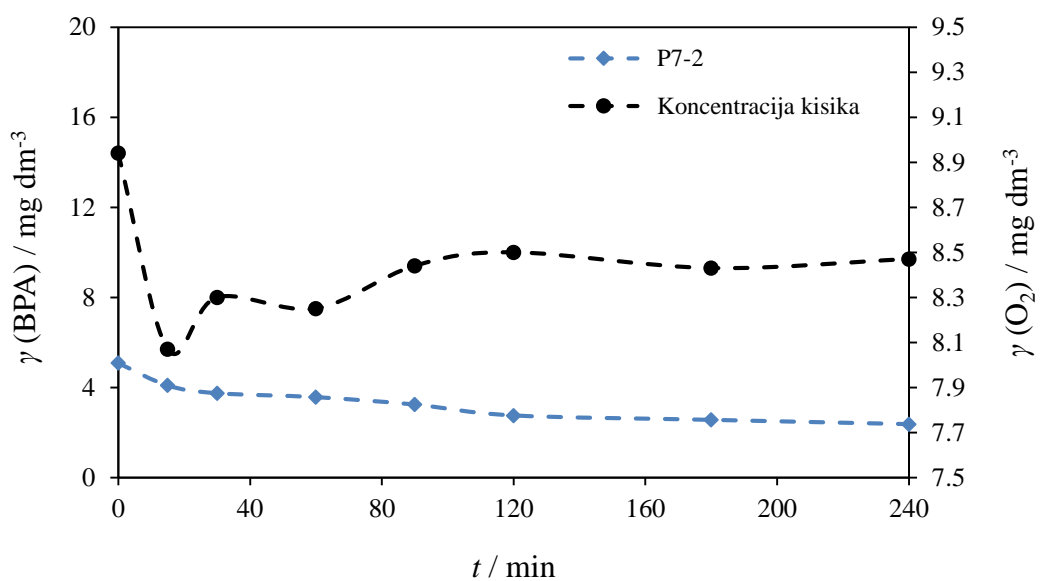
Slika 4.22. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P6 – 6.



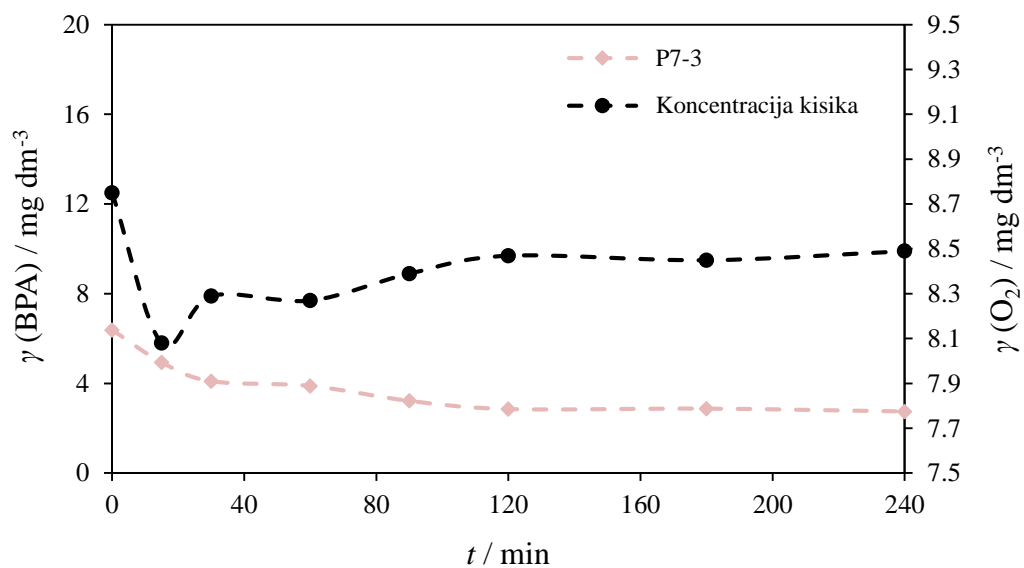
Slika 4.23. Promjena pH-vrijednosti tijekom četiri sata u pokusima od P6 -1 do P6 – 6.



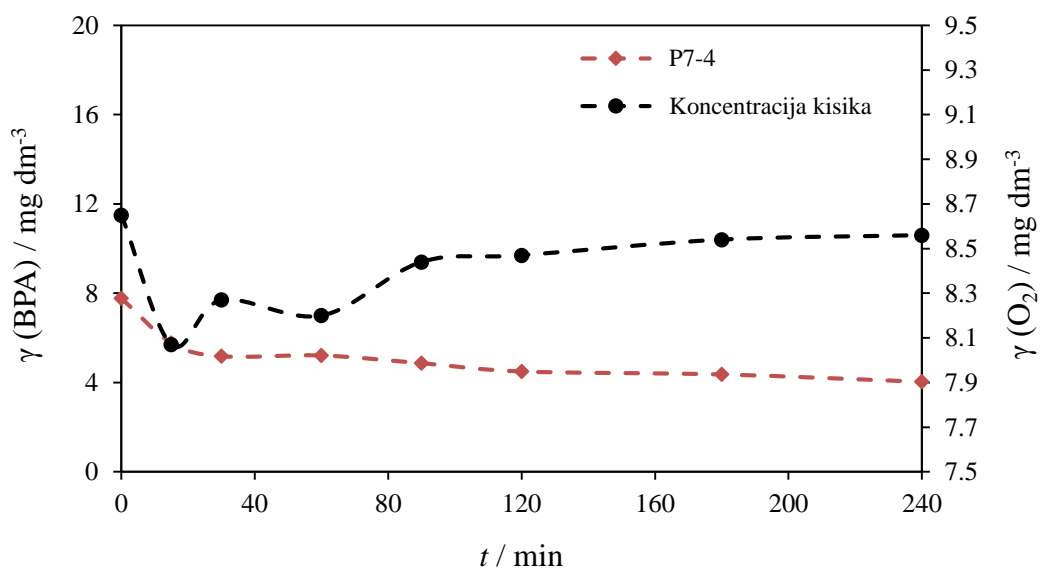
Slika 4.24. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P7 – 1.



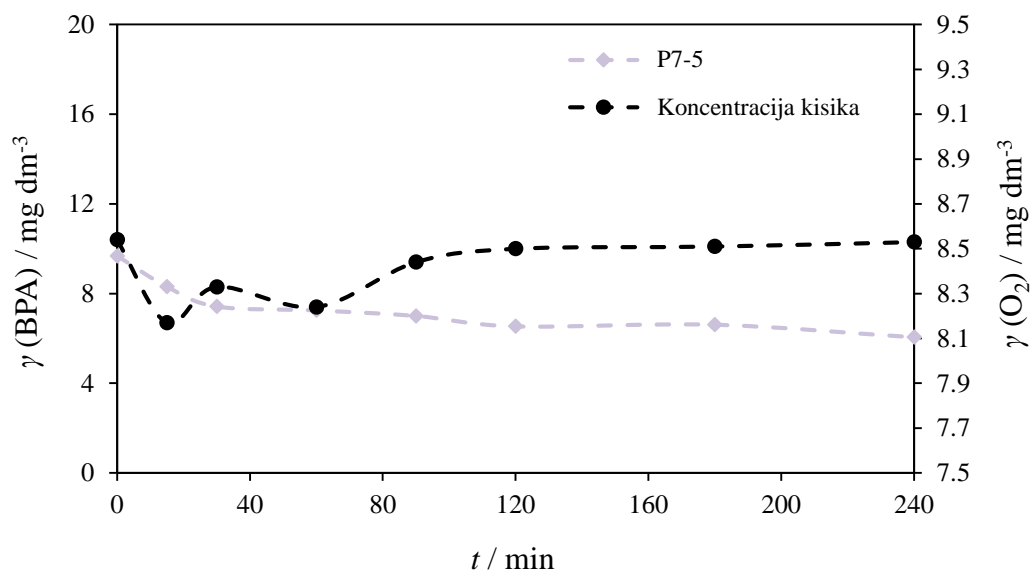
Slika 4.25. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P7 – 2.



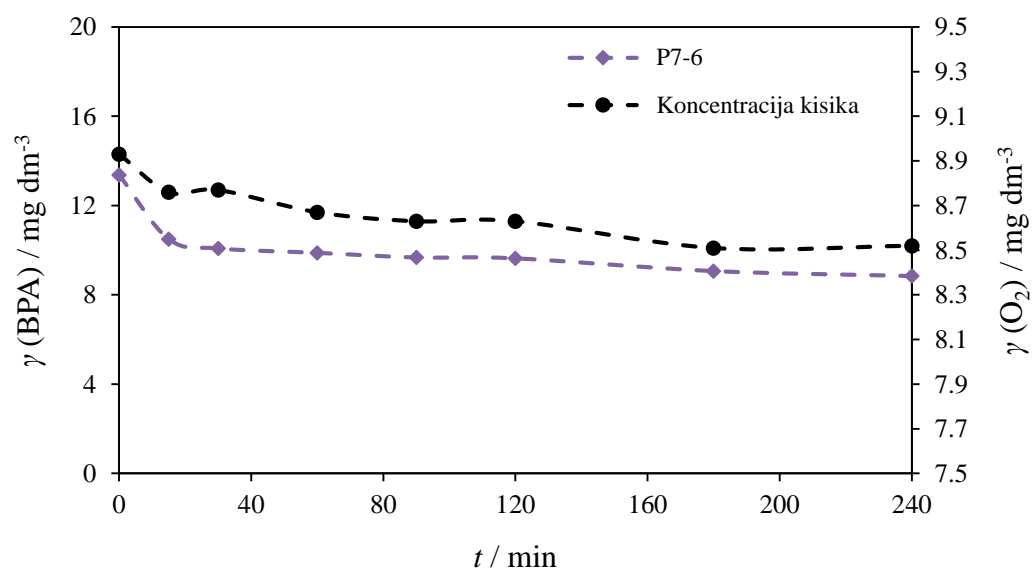
Slika 4.26. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P7 – 3.



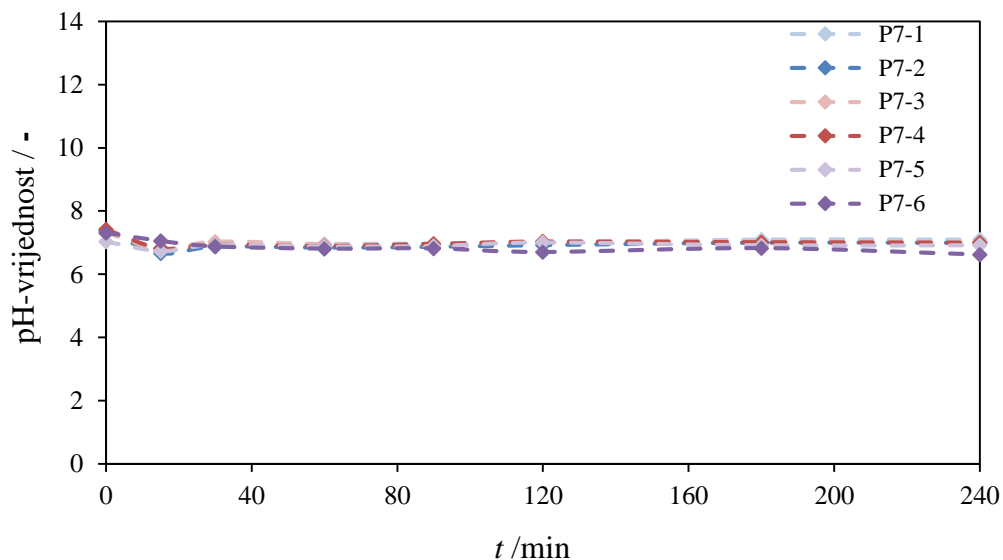
Slika 4.27. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P7 – 4.



Slika 4.28. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P7 – 5.



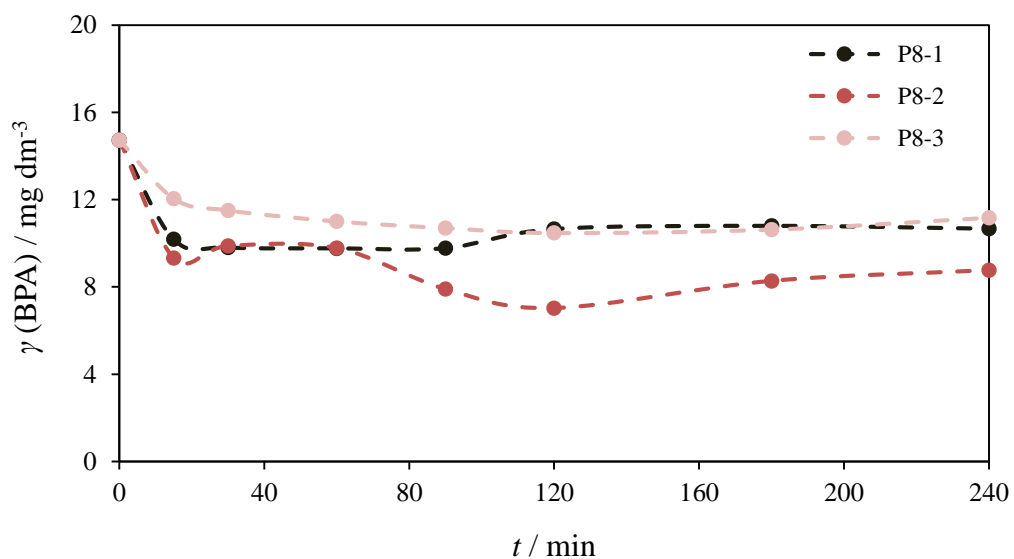
Slika 4.29. Promjena koncentracije BPA i kisika tijekom četiri sata u pokusu P7 – 6.



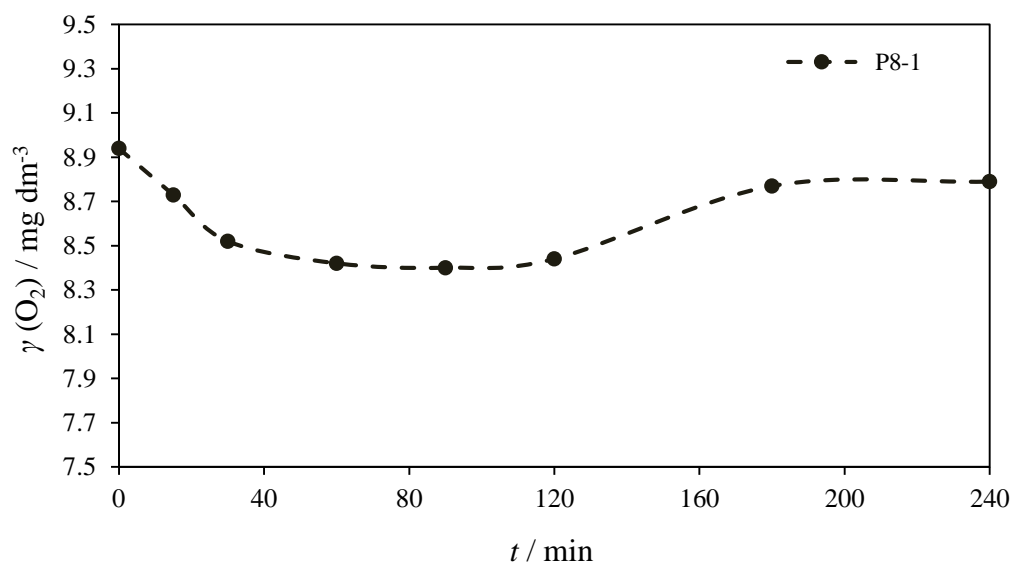
Slika 4.30. Promjena pH-vrijednosti tijekom četiri sata u pokusima od P7 -1 do P7 – 6.

4.6. Utjecaj temperature na biorazgradnju BPA

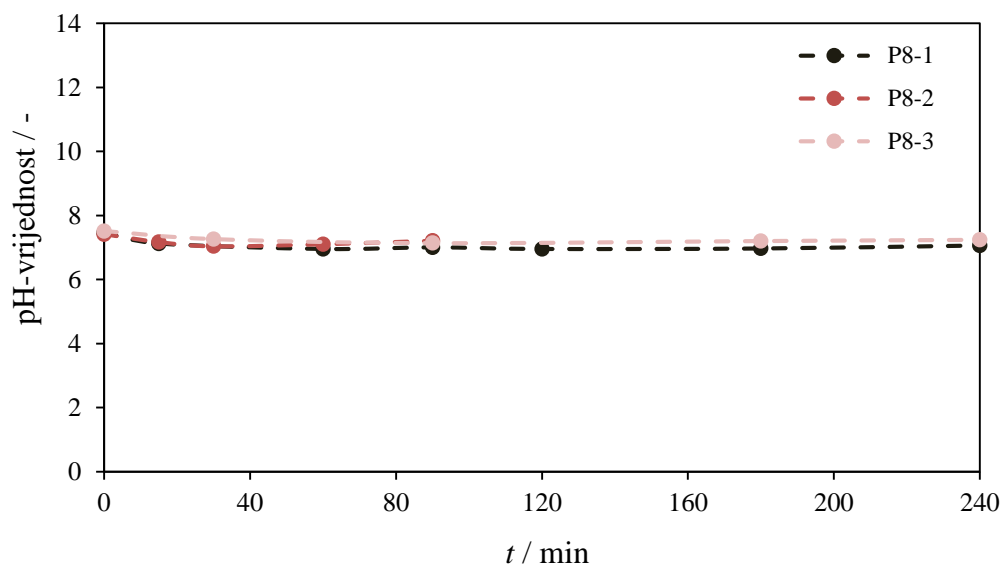
U ovom poglavlju prikazani su rezultati pokusa P8 i P9. Proces biorazgradnje provodio se prema uvjetima danim u tablici 3.6. Rezultati provedbe pokusa P8 (*Streptomyces* sp.) prikazani su u slikama 4.31., 4.32. i 4.33., a rezultati pokusa P7 (*Pseudomonas aeruginosa* BSW) u slikama 4.34., 4.35. i 4.36.



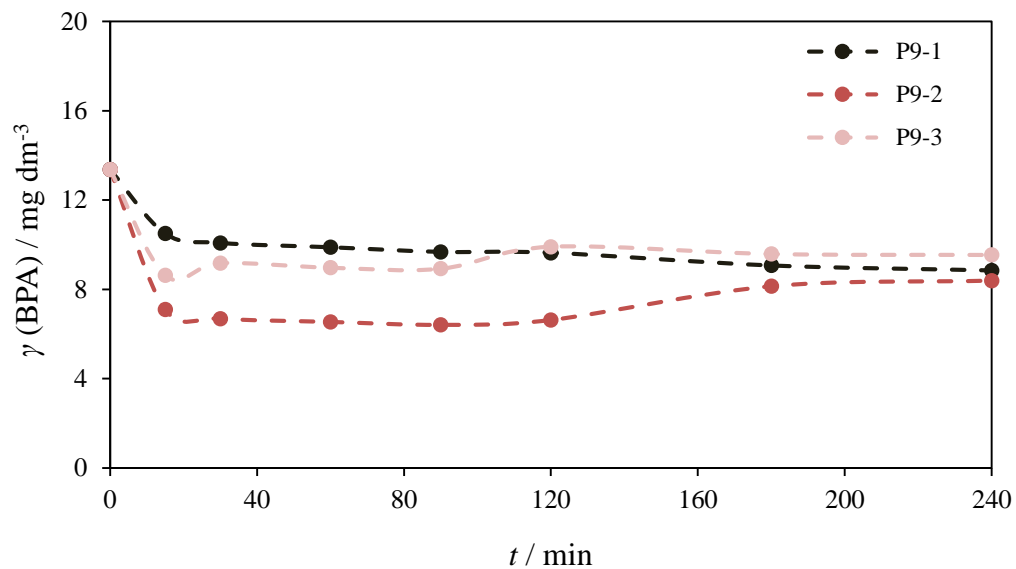
Slika 4.31. Promjena koncentracije BPA tijekom četiri sata u pokusu P8.



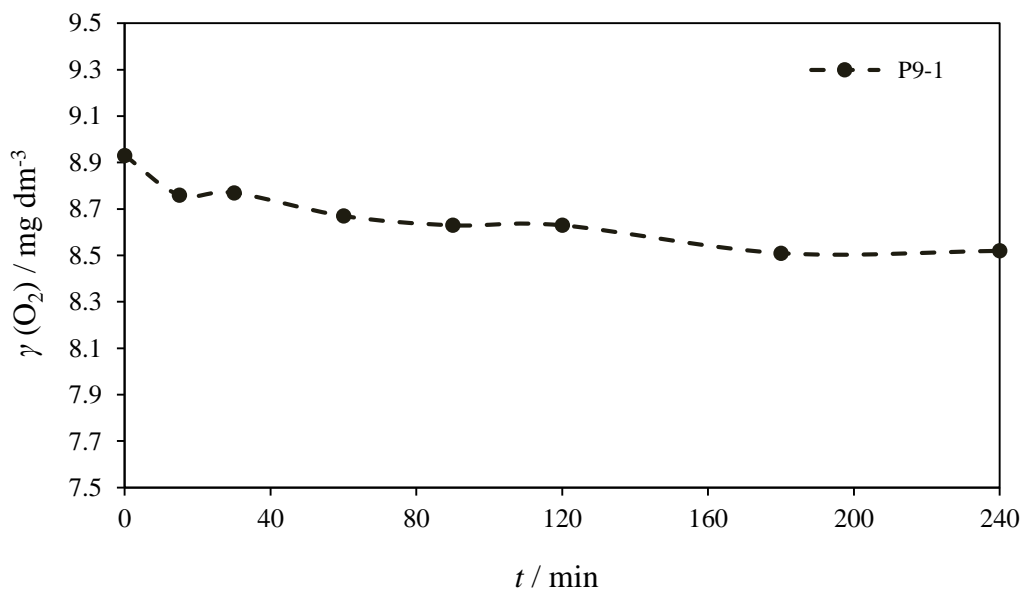
Slika 4.32. Promjena koncentracije kisika tijekom četiri sata u pokusu P8 pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



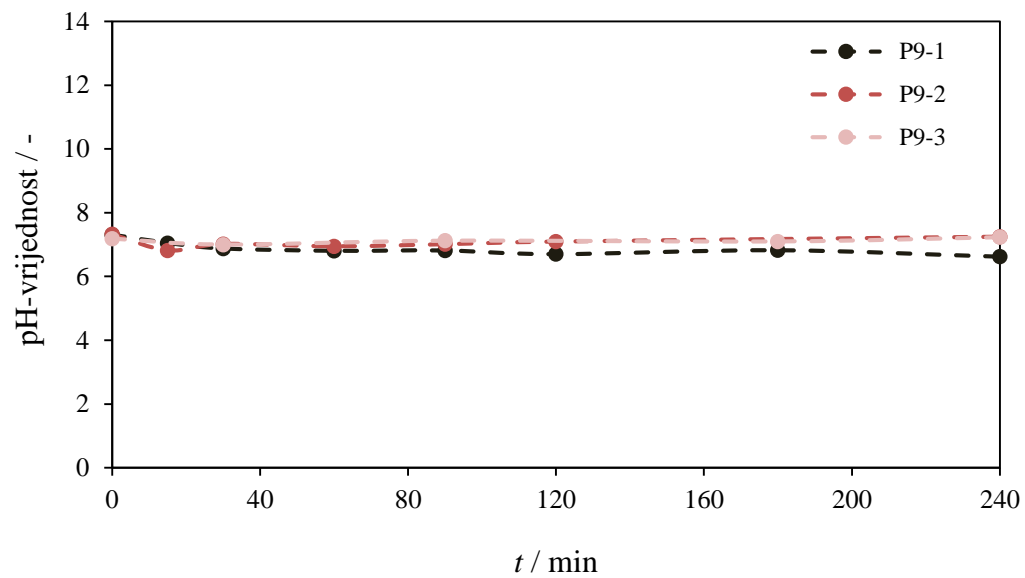
Slika 4.33. Promjena pH-vrijednosti pri različitim temperaturama tijekom četiri sata u pokusu P8.



Slika 4.34. Promjena koncentracije BPA tijekom četiri sata u pokusu P9.



Slika 4.35. Promjena koncentracije kisika tijekom četiri sata u pokusu P9 pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 4.36. Promjena pH-vrijednosti tijekom četiri sata u pokusu P9.

5. RASPRAVA

U posljednjih nekoliko godina sve je više pažnje posvećeno BPA i njegovom štetnom djelovanju na ljude i okoliš budući da je otkriveno njegovo prisutstvo u rijekama, morima i tlu. Zbog povećanja svijesti o njegovom štetnom djelovanju sve više organizacija promovira pravilno zbrinjavanje otpada čiji je BPA jedan od glavnih sastojaka. BPA u okoliš najčešće dopijeva razgradnjom nepravilno odloženog plastičnog otpada gdje se zbog svoje strukture teško uklanja.^{1, 2, 3, 19, 41}

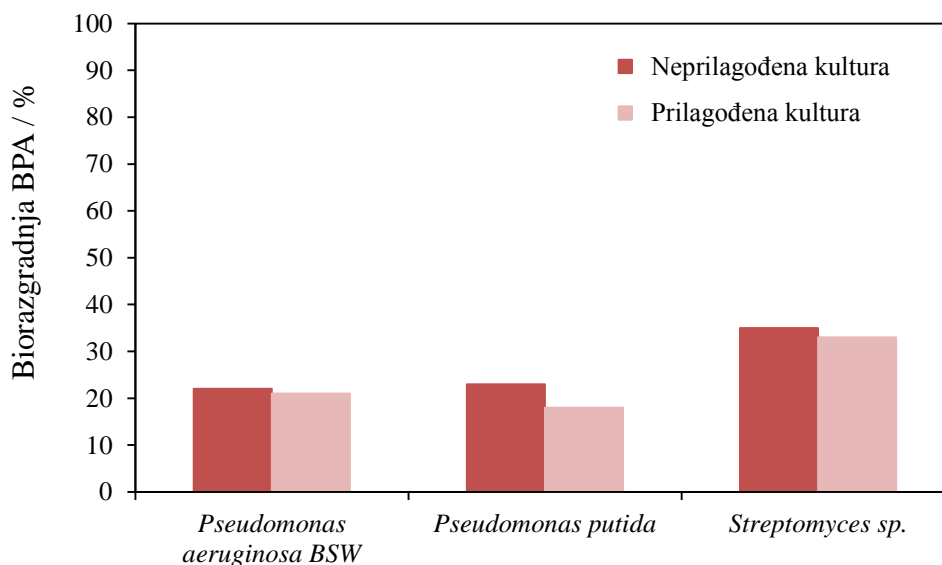
Cilj ovog rada bio je pronaći optimalne uvjete za uklanjanje BPA iz vodene otopine procesom biorazgradnje. Ispitala su se tri mikroorganizma, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas aeruginosa* BSW te *Pseudomonas putida*, na učinkovitost biorazgradnje BPA te su ispitani različiti čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje poput temperature, pH-vrijednosti, optičke gustoće i početne koncentracije BPA. *Streptomyces* sp., mikroorganizam koji daje specifični miris zemlji, odabran je za ovaj pokus zbog postojanja u tlu. *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* se također nalaze u okolišu, izolirane su iz biootpada odnosno aktivnog mulja koji se koristi pri biološkoj obradi otpadne vode.

5.1. Razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

U svrhu razvoja HPLC metode za određivanje koncentracije BPA korišteno je pet unaprijed pripremljenih otopina BPA poznatih koncentracija (tablica 3.1.). Iz slike 4.1. može se vidjeti da pik BPA izlazi u 4 minuti, te povećanjem koncentracije BPA površina pika se razmjerno povećava što ukazuje i dobiveni baždarni pravac (slika 4.2.), odnosno regresijski koeficijent, R^2 , koji iznosi 0,9999. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da zadani uvjeti (protok, mobilna faza i vrijeme zadržavanja) za razvoj metode za određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti daju dobro razdvajanje pika od voida, pik je oštar, odnosno ovom metodom može se odrediti koncentracija BPA. Koncentracija BPA će se odrediti tako što će se očitati površina BPA iz kromatograma koja će se zatim uvrstiti u dobivenu jednadžbu pravca (slika 4.2.).

5.2. Biorazgradnja BPA s različitim kulturama

Provođenjem pokusa P1 dobiveni su rezultati biorazgradnje BPA s neprilagođenim i prilagođenim bakterijskim kulturama. Iz grafičkog prikaza (slika 5.1.) vidljivo je da neprilagođene kulture nešto bolje razgrađuju BPA u odnosu na prilagođene kulture što se može prepisati zasićenju bakterijske stanice s BPA. Nadalje, najviše BPA je razgradio *Streptomyces* sp. (oko 35 %), dok su *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* otprilike podjednako razgradile BPA (oko 25 %) unutar dva sata što se slaže i sa objavljenom literaturom.^{2, 60, 61} Iz slika 4.3. i 4.4. može se vidjeti da je najintenzivnija biorazgradnja BPA bila unutra dva sata, te nakon dva sata koncentracija BPA je malo porasla najvjerojatnije zbog desorpcije BPA te se nakon toga neznatno mijenjalo. Tijekom procesa biorazgradnje BPA često dolazi i do procesa biosorpcije na određeni mikroorganizam. S obzirom na navedene rezultate u daljnjim eksperimentima radilo se sa neprilagođenim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. tijekom četiri sata.

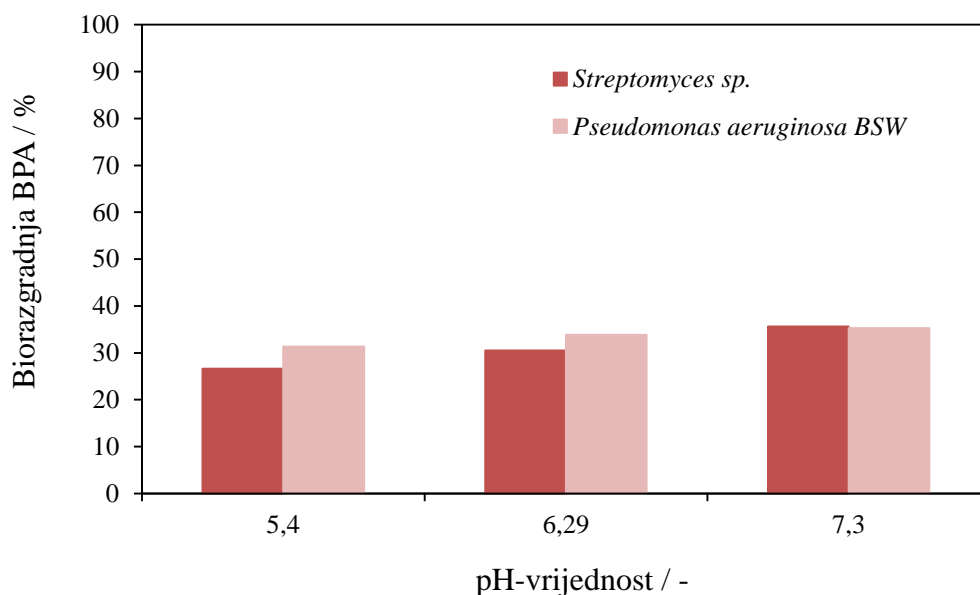


Slika 5.1. Usporedba razgradnje BPA sa prilagođenim i neprilagođenim bakterijskim kulturama tijekom dva sata provođenja pokusa P1.

5.3. Utjecaj različitih pH-vrijednosti na biorazgradnju BPA

Provedbom pokusa P2 i P3 (tablica 3.3.) dobiveni su rezultati biorazgradnje BPA sa *Streptomyces* sp. odnosno s *Pseudomonas aeruginosa* BSW pri različitim početnim pH-vrijednostima u rasponu od 5 do 7,5.

Biorazgradnja BPA ispitivala se pri navedenim pH-vrijednostima jer prema literaturi^{28, 61, 62} jedan od čimbenika koji utječe na rast bakterija je i pH-vrijednost koja je optimalna za bakterije između 5,5 i 8,8. Iz slika 4.5. i 4.8. vidljivo je smanjenje koncentracije BPA pri svim pH-vrijednostima. Koncentracija BPA najviše se smanjila pri pH-vrijednosti 7,3 (P2 i P3) (35 %) što se slaže sa prethodno navedenim vrijednostima optimalnog pH za rast bakterija. Pri pH-vrijednostima 5 i 6 u pokusima biorazgradnje BPA sa *Streptomyces* sp. (P2) uklonilo se 26 % odnosno 30 % BPA, a u pokusima sa *Pseudomonas aeruginosa* BSW (P3) 31 % odnosno 33 % (slika 5.2.). Nadalje, najintenzivnija biorazgradnja bila je unutar 30 minuta što se i slaže sa padom koncentracije kisika u pokusima P2 i P3 (slike 4.6. i 4.9.). Do pada koncentracije kisika dolazi zbog toga što je mikroorganizmima za biorazgradnju potreban kisik, što više metaboliziraju organsku tvar to više kisika troše.^{27, 28} Najveći pad koncentracije kisika vidljiv je u pokusu P2-3 gdje se i najviše BPA razgradilo. U pokusu P3 pad koncentracije kisika je pri svim pH-vrijednostima isti što se i vidi iz neznatne razlike u postotku biorazgradnje BPA. Naime, *Pseudomonas aeruginosa* BSW je specifičan mikroorganizam koji uspješno razgrađuje organske tvari pri širokom rasponu pH-vrijednosti i temperature. Nakon 30 minuta koncentracija BPA se neznatno mijenjala, a koncentracija kisika je ponovno počela rasti. Tijekom procesa pH-vrijednost se nije značajno mijenjala u pokusima P2 i P3 (slike 4.7. i 4.10.)

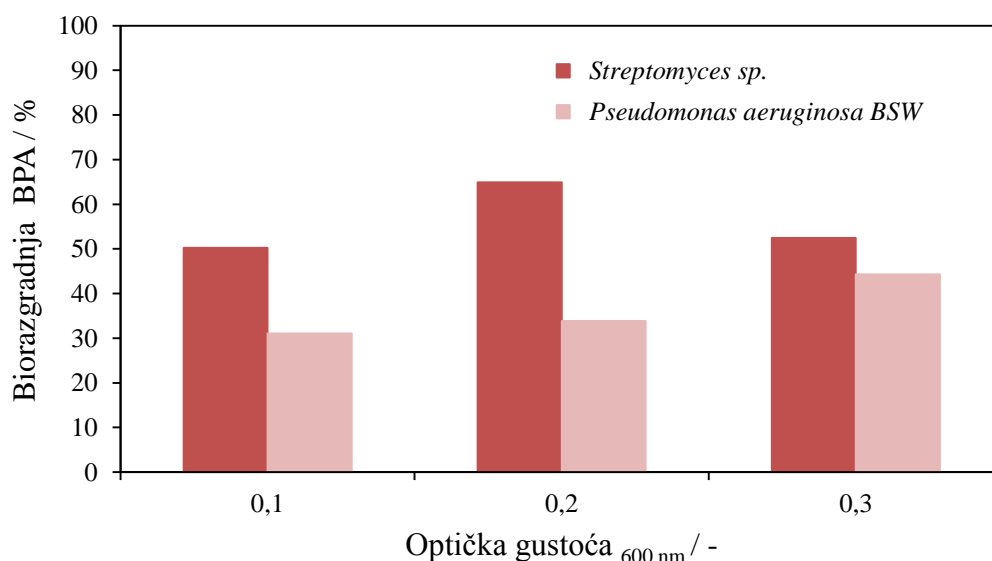


Slika 5.2. Usporedba biorazgradnje BPA u pokusima P2 i P3.

5.4. Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA

U pokusima P4 i P5 (tablica 3.4.) dobiveni su rezultati biorazgradnje BPA pri različitim početnim optičkim gustoćama *Streptomyces* sp. odnosno *Pseudomonas aeruginosa* BSW. Iz slike 4.11. i 4.14. vidljivo je da je najintenzivnija biorazgradnja u prvih 30 min odnosno 60 min što se slaže sa padom koncentracije kisika u oba pokusa (slike 4.12. i 4.15.). U pokusu P4 najviše BPA se biorazgradilo pri optičkoj gustoći 0,2 (P4-2) (65 %), a najmanje pri 0,1 (P4-1) (50 %) (slika 5.2.). Razlog tome može biti što pri većoj optičkoj gustoći dolazi do kompeticije za hranom odnosno BPA-om, a pri nižoj optičkoj gustoći je manji broj stanica bakterija.⁶³ U pokusu P5 s *Pseudomonas aeruginosa* BSW najviše BPA (44 %) se razgradilo pri najvećoj optičkoj gustoći od 0,3 (P5-3), a najmanje pri najmanjoj optičkoj gustoći od 0,1 (P5-1) 31 % (slika 5.2.). Prema navedenom se može zaključiti da svaki mikroorganizam drugačije funkcionira u nekom sustavu, odnosno da na njihovu sposobnost biorazgradnje utječu mnogi čimbenici te ne postoji pravilo po kojem će svi mikroorganizmi pri istim uvjetima dati podjednaki trend rezultata. pH-vrijednost u oba pokusa, P4 i P5, se nije mijenjala tijekom procesa. Iz slike 5.2. može se vidjeti da biorazgradnja BPA je bila najbolja primjenom bakterijske kulture *Streptomyces* sp. pri svim optičkim gustoćama.

Tijekom procesa optička gustoća *Streptomyces* sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW je rasla što ukazuje na povećanje koncentracije biomase. Maksimum apsorbancije BPA je pri valnoj duljini od 600 nm te se zbog toga optička gustoća mjerila pri toj valnoj duljini.^{41, 57}



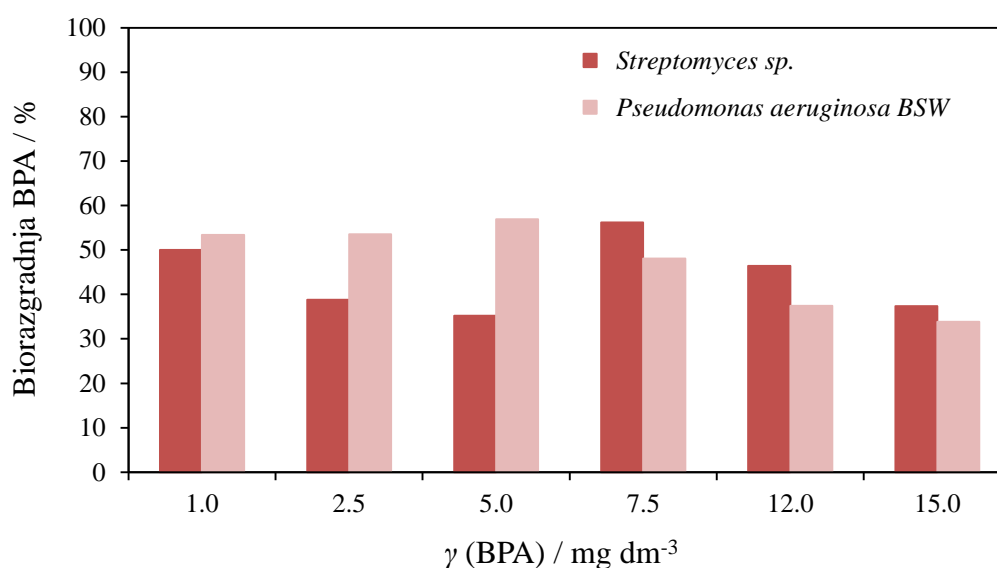
Slika 5.3. Usporedba biorazgradnje BPA za pokuse P4 i P5.

5.5. Utjecaj različitih koncentracija na biorazgradnju BPA

Provedbom pokusa P6 i P7 (tablica 3.5.) dobiveni su rezultati biorazgradnje BPA sa *Streptomycesom* sp. i *Pseudomonas aeruginosom* BSW pri različitim početnim koncentracijama BPA. Sa slika 4.17. - 4.22. te 4.24. – 4.29. vidljivo je smanjenje koncentracije BPA u vremenu za sve početne koncentracije BPA te najintenzivnija biorazgradnja je bila u prvih 30 minuta, što pokazuje i pad koncentracije kisika. Najveći pad koncentracije kisika (sa 9 na 7,5 mgO₂ dm⁻³) zabilježen je u oba pokusa (P6 i P7) u 15 minuti i to pri najnižim koncentracijama BPA. Pri većim koncentracijama BPA nije zabilježen takav pad kisika. Nakon 60 minuta procesa koncentracija BPA u svim pokusima se nije značajno mijenjala, a pH-vrijednost je bila konstantna tijekom cijelog procesa u oba pokusa (slika 4.23. i 4.30.). Prema istraživanju⁵ *Streptomyces* sp. pri temperaturi od 30 °C i početnoj koncentraciji BPA od 1 mg dm⁻³ može razgraditi više od 90 % BPA unutar 10 dana. U ovom pokusu unutar četiri sata *Streptomyces* sp. (pri γ_0 (BPA) = 1 mg dm⁻³) razgradio je oko 50 % BPA iz čega možemo pretpostaviti da se većina biorazgradnje BPA *Streptomycesom* sp. događa unutar prvih 24 sata.

S obzirom da se većina istraživanja temelji na mogućnosti uklanjanja BPA bakterijskom kulturom *Pseudomonas aeruginosa*^{2, 60, 61, 62}, ovaj pokus vrlo je važan kako bi se pokazalo da i *Streptomyces* sp., koji je prisutan u sastavu tla, dobro razgrađuje BPA svih početnih koncentracija (slika 5.4.).

Prema istraživanju ⁴, gram negativne bakterije, izolirane iz rijeka, *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas putida* pri γ_0 (BPA) = 1 mg dm⁻³ te 30°C unutar 10 dana mogu razgraditi do 91% BPA. Najveće smanjenje koncentracije BPA, odnosno najveća biorazgradnja događa se unutar prvih 72 sata. S obzirom na razna istraživanja ^{2, 4, 60, 61} i na provedbom ovog pokusa možemo reći da sve bakterije roda *Pseudomonas* dobro razgrađuju BPA bez obzira iz koje okoline su bakterijske kulture izolirane. Iz slike 5.4. može se vidjeti da pri nižim koncentracijama BPA *Pseudomonas aeruginosa* BSW bolje razgrađuje BPA nego *Streptomyces* sp., dok je pri višim koncentracijama obrnuto.



Slika 5.4. Usporedba biorazgradnje BPA za pokuse P6 i P7.

5.6. Utjecaj različitih temperatura na biorazgradnju BPA

Provedbom pokusa P8 i P9 pokazano je da bakterijskim kulturama, *Streptomyces* sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW, za razgradnju BPA najviše pogoduje temperatura od 35 °C. Na grafičkom prikazu ovisnosti koncentracije BPA o vremenu (slike 4.31. i 4.34.) vidljivo je najveće smanjenje koncentracije BPA upravo pri temperaturi od 35 °C.

Za rast i razvoj mikroorganizama optimalni su uvjeti između 15°C i 45°C, odnosno uvjeti sobne ili blago povišene temperature.^{28, 61}

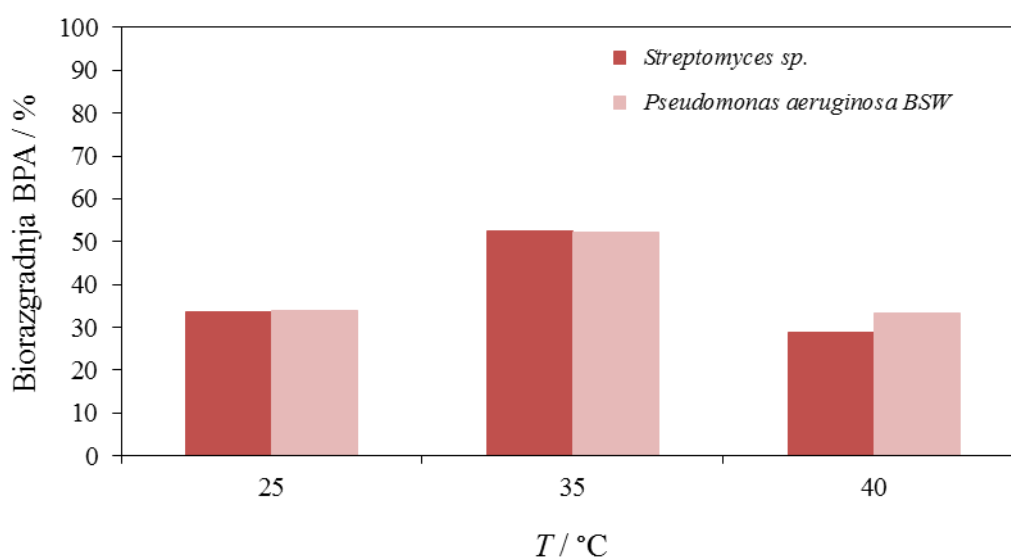
Obje bakterijske kulture podjednako su razgradile BPA pri temperaturi od 25°C i 35°C dok je pri temperaturi od 40°C *Pseudomonas aeruginosa* BSW bolje razgradio prisutan BPA.

Kao što je već spomenuto *Pseudomonas aeruginosa* je specifičan mikroorganizam koji ima široki raspon područja djelovanja te je korišten *Pseudomonas* u ovome pokusu izoliran iz biootpada tijekom procesa kompostiranja u termofilnoj fazi.

Prema dosadašnjim provedenim istraživanjima, *Pseudomonas aeruginosa* preživljava povišene temperature i učinkovito metabolizira organske tvari.⁶³ U Zavodu za industrijsku ekologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije izoliran je također *Pseudomonas aeruginosa* FN iz duhanskog otpada te je tijekom cijelog procesa kompostiranja bio prisutan i rastao na temperaturi od 50°C.

Pri višim temperaturama nije se mogla odrediti koncentracija kiska jer je koncentracija kisika izrazito osjetljiva na promjenu temperature, a prilikom mjerenja kisika temperatura se mijenjala te se koncentracija kisika nije mogla ustabiliti.

Prema slici 4.32. vidljivo je da pri temperaturi od 25 °C koncentracija kisika u vremenu opada, međutim nije moguće sa sigurnošću reći da li bi se porastom temperature (na 35°C ili 40°C) koncentracija kisika još više smanjila ili povećala. pH vrijednost u svim suspenzijama pri različitim temperaturama bila je konstantna (slika 4.33. i slika 4.36.).



Slika 5.5. Usporedba biorazgradnje BPA za pokuse P8 i P9.

6. ZAKLJUČCI

Budući da su vode onečišćene s BPA, koji ima negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš, u ovom radu provedeni su pokusi uklanjanja istog u svrhu poboljšanja kvalitete života i očuvanja okoliša. Pokusi su provedeni s različitim bakterijskim kulturama izoliranim iz okoliša pri različitim pH-vrijednostima, optičkim gustoćama bakterijske suspenzije, koncentracijama BPA i temperaturama te su dobiveni sljedeći zaključci:

(1) Biorazgradnja BPA u vodi bolja je sa neprilagođenim bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* BSW, *Pseudomonas putida* i *Streptomyces* sp. *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* razgradile su 25 % BPA dok je *Streptomyces* sp. razgradio 35 % unutar 4 sata.

(2) *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. najbolje su razgradile BPA u vodi pri pH vrijednosti 7,3. Biorazgradnja BPA sa oba mikroorganizma pri toj pH-vrijednosti iznosila je 35%.

(3) Optička gustoća u vrijednosti 0,2 odnosno 0,3 najbolje je pogodovala biorazgradnji BPA u vodi sa *Streptomycesom* sp. odnosno *Pseudomonas aeruginosom* BSW i iznosila je 65 % odnosno 44 %.

(4) Najučinkovitija biorazgradnja BPA u vodi s *Pseudomonas aeruginosom* BSW odnosno *Streptomycesom* sp. bila je pri početnoj koncentraciji BPA od 5 mg dm⁻³ odnosno 7,5 mg dm⁻³ i iznosila je u oba slučaja 57 %.

(5) Pri temperaturi od 35°C postignuto je najučinkovitije uklanjanje BPA u vodi sa *Pseudomonas aeruginosom* BSW i *Streptomycesom* sp. Biorazgradnja BPA iznosila je 52 %.

(6) Biorazgradnja BPA u vodi sa *Pseudomonas aeruginosom* BSW i *Streptomycesom* sp. najveća je u prvih 30 do 60 minuta provođenja pokusa.

7. LITERATURA

1. Mandić, D., Toksikološke značajke bisfenola A, Osijek, 2006.
2. Kang, J., Katayama, Y., Kondo, F., Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals, *Toxicology*, 217 (2006) 81–90
3. Rykowska, I., Wasiak, W., Properties, Threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives, *Acta chromatogr.*, 16 (2006)
4. Kang, J.-H., Kondo, F., Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 43 (2002a) 265-269
5. Kang, J.-H., Ri, N., Kondo, F., *Streptomyces* sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability, *Lett. Appl. Microbiol.*, 39 (2004) 178–180
6. Sasaki, M., Maki, J., Oshiman, K., Matsumura, Y., Tsuchido, T., Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp strain AO1, *Biodegradation* 16, 2005.,449-459.
7. Yim, S.H., Kim, H.J., Lee, I.S., Microbial metabolism of the environmental estrogen bisphenol A, *Arch. Pharm. Res.* 10 (2003) 805–808.
8. Chai, W., Handa, Y., Suzuki, M., Saito, M., Kato, N., Horiuchi, C.A., Biodegradation of bisphenol A by fungi, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120 (2005) 175–182.
9. Hirooka, T., Akiyama, Y., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K., Miyamoto, K., Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions, *J. Eiosci. Bioeng.*, 95 (2003) 200–203.
10. Imanaka, M., Sasaki, K., Nemoto, S., Ueda, E., Murakami, E., Miyata, D., Tonogai, Y., Determination of bisphenol A in foods using GC/MS, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 42(2) (2001) 71-78.
11. Goodson, A., Summerfield, W., Cooper, I., Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 796–802.
12. Thomson, B.M., Grounds, P.R., Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 65–72.
13. Munguia-Lopez, E.M., Gerardo-Lugo, S., Peralta, E., Bolumen, S., Soto-Valdez, H., Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into fatty-food simulant and tuna fish, *Food Addit Contam.*, 22 (2005) 892–898
14. Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H., Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography, *Food Addit Contam.*, 18 (2001) 69–75

15. Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Olea, N.. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans, *Environ Health Perspect* , 103 (1995) 608–612.
16. Horie, M., Yoshida, T., Ishii, R., Kobayashi, S., Nakazawa, H., Determination of bisphenol A in canned drinks by LC/MS, *Bunseki Kagaku* , 48 (1999) 579–587.
17. Kang, J.H., Kito, K., Kondo, F., Factors influencing the migration of bisphenol A from cans, *J Food Prot*, 66 (2003) 1444–1447
18. Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C., Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids, *J Agric Food Chem*, 45 (1997) 3541–3544.
19. Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E., Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective, *J Environ Manage.*, 104 (2012) 19–34
20. Perušina, M., Značajke i obrada industrijskih otpadnih voda (Završni rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2010)
21. Adanić, D., Industrijske otpadne vode (Završni rad), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac (2016)
22. Gusak, H., Kemijska kakvoća otpadnih voda Brodsko-posavske županije (Završni rad), Veleučilište u Požegi, Požega (2016)
23. Janton, N., Biološko uklanjanje fenola iz otpadnih voda (Završni rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2015)
24. Tušar B., Pročišćavanje otpadnih voda, Kigen d.o.o., Zagreb (2009) 51-69, 73-121
25. Briški, F., Zaštita okoliša, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Element d. o. o., Zagreb (2016) 67-103
26. Krivičić, D., Remedijacija otpadne vode iz procesa proizvodnje maslinovog ulja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2015)
27. Raičević, V., Lalević, B., Dabić, D., Kiković, D., Jovanović, LJ., Nikšić M., Mikroorganizmi u bioremedijaciji zemljišta i voda, *Zaštita materijala* , 48(2) (2007) 49-52
28. Bertović, B., Bioremedijacija zemlje onečišćene naftnim ugljikovodicima, *Goriva i maziva*, 55(4) (2016) 295-305
29. Duraković, S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
30. Duraković, S., Primjenjena mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

- 31.** Landeka Dragičević, T., Toksični organski spojevi ksenobiotici, kolegij Biološka razgradnja organskih spojeva, Prehranbeno-biotehnološki fakultet, prezentacija (2012./2013.), preuzeto (20.travnja,2018.) sa: http://www.pbf.unizg.hr/content/download/24146/94525/version/1/file/BROS_Toksi%C4%8Dni+organski+spojevi+-+ksenobiotici_2012_2013+%5BCompatibility+Mode%5D.pdf
- 32.** Speight, J., El-Gendy, N.S., Introduction to petroleum biotechnology, Gulf Professional Publishing (2017)
- 33.** Ike, M., Jin, C.S., Fujita, M., Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. *Water Sci. Technol.*, 42 (2000) 31–38.
- 34.** Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M., Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (2000) 1958–1962.
- 35.** Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T., Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes, *Chemosphere*, 42 (2001) 271-276
- 36.** Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T., Suzuki, M., Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284 (2001) 704-706
- 37.** Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T., Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287 (2001) 355-358
- 38.** Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., Nishida, T., Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.*, 37 (2003) 1972–1975.
- 39.** Lee, S.M., Koo, B.W., Choi, J.W., Chai, D.H., An, B.S., Jeung, E.B., Choi, I.G., Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (2005) 201–207.
- 40.** Ishihara, K., Nakajima, N., Improvement of marine environmental pollution using ecosystem: decomposition and recovery of endocrine disrupting chemicals by marine phyto- and zooplanktons., *J. Mol. Catal. B*, 23 (2003) 419–424.
- 41.** Eio, E.J., Kawai, M., Tsuchiya, K., Yamamoto, S., Toda, T., Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 96 (2014) 166-173
- 42.** Kalenić, S., Mlinarić-Missoni, E., *Medicinska bakteriologija i mikologija*, Merkur A.B.D, Zagreb (2001)

43. Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S., *Molecular Medical Microbiology*, Academic press, (2015) 753-767
44. Prince, A.S., *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, (2012) 842-846
45. Rimac, T., Optimiranje uvjeta indukcije biomase *Pseudomonas sp. VLB120ΔC* u procesu biotransformacije stirena u (S)-stiren oksid (Završni rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2016)
46. <http://www.rajvienterprise.co.in/pseudomonas-denitrificans-3326299.html> (pristup 8. ožujka, 2018.)
47. <http://www.in.gr/files/temp2/10100520a1b499e14288234302d47bd7790cd2e81210e646f1ce71e8205f7443.jpg> (pristup 8. ožujka, 2018.)
48. Dyson, P., *Streptomyces, Molecular Biology and Biotechnology*, Caister Academic Press, (2011) 44-47
49. <http://www.actino.jp/DigitalAtlas/data/8/8-5.jpg> (pristup 8. Ožujka, 2018.)
50. Shin, Eun-Hye, Hyoung Tea Choi, Hong-Gyu Song, Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol A by white rot fungus *Irpex lacteus*, *J.Microbiol.biotechnol.*, 17 (7) (2007) 1147 – 1151
51. de Freitas, E.N., Bubna, G.A., Brugnari, T., Kato, C.G., Nolli, M., Rauen, T.G., de Fatima Peralta Muniz Moreira, R., Peralta, R.A., Bracht, A., de Souza, C.G.M., Peralta, R.M., Removal of bisphenol A and evaluation of ecotoxicity of degradation products by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*, *Chemical Engineering Journal*, 330 (2017) 1361-1369
52. http://1.bp.blogspot.com/-Wfa2sJt1zyM/Ty6atj_Cq9I/AAAAAAAAAG3Q/71j4G1kP4S8/s1600/dscn4081.jpg (pristup 16. travnja, 2018.)
53. <https://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/99> (pristup 8. Ožujka, 2018.)
54. Borković, I., Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje alendronata (Završni rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2016)
55. Vurovec, M., Fotooksidativna razgradnja pesticida u vodi (Diplomski rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2016)
56. Ašperger, D., Karakterizacija Materijala, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2014)
57. Ronen, Z., Abelovich, A., Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A, *Appl Environ Microbiol.*, 66(6) (2000) 2372–2377
58. Kajić, S., Prezentacija za predavne iz kolegija Uvod u mikrobiologiju tla, Agronomski fakultet, Zagreb (2017)

- 59.** Laboratorijske vježbe – Mikrobiologija, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2017)
- 60.** Cydzik – Kwiatkowska, A., Zielinska, M., Microbial composition of biofilm treating wastewater rich in bisphenol A, *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 53(4) (2017) 385-392
- 61.** Vijayalakshmi, V., Senthilkumar, P., Mophin – Kani, K., Sivamani, S., Sivarajasekar, N., Vasantharaj, S., Bio-degradation od bisphenol A by *Pseudomonas aeruginosa* Pab1 isolated from effluent of thermal paper industry: Kinetic modeling and process optimization, *J Radiat Res Appl Sci*, (2017) 1 - 10
- 62.** Kamaraj, M., Sivaraj, R., Venckatesh, R., Biodegradation of bisphenol A by the tolerant bacterial species isolated from coastal regions of Chennai, Tamil Nadu, India, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 93 (2014) 216 - 222
- 63.** Herner, Ž., Kučić, D., Zelić, B., Biodegradation of imidacloprid by composting process, *Chem. Pap.*, 71 (2017) 13–20

SAŽETAK

Antonija Kovačević, Ema Lovrinčić

Biorazgradnja bisfenola A u vodi

Bisfenol A (BPA) je sveprisutni organski spoj koji se primjenjuje u proizvodnji polikarbonata, epoksi smola i raznih drugih materijala. Polikarbonati se koriste u proizvodnji plastičnih ambalaža za hranu i piće, bočica za djecu, kuhinjskih pomagala, pakiranju lijekova, elektroničke opreme. Epoksi smole koriste se u proizvodnji boja, metalnih konzervi za hranu i piće, bačve za vino i u stomatologiji. BPA dospijeva u okoliš, odnosno u tlo i vode, tijekom kemijske proizvodnje, transporta ili prerade te neispravnim odlaganjem proizvoda koji ga sadržavaju. Zanimljiv je zbog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje, životinjski svijet i okoliš te ga je potrebno ukloniti. U vodenim sustavima provodi se biorazgradnja BPA primjenom različitih mikroorganizama koji imaju sposobnost razgraditi ga.

U ovom radu provedena je biorazgradnja BPA u vodenoj otopini s bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* BSW, *Pseudomonas putida* i *Streptomyces* sp. u šaržnim uvjetima rada. *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* izolirane su iz biootpada, odnosno aktivnog mulja i imaju sposobnost razgradnje organskih, toksičnih spojeva. *Streptomyces* sp. se nalazi u tlu i također ima sposobnost razgradnje organskih spojeva.

Pokusima su ispitani različiti čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje BPA, poput pH-vrijednosti (5, 6 i 7), koncentracije biomase *P. aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. (0,1; 0,2; 0,3), koncentracije BPA (od 0 do 15 mg dm⁻³) i temperature (25, 35 i 40°C).

Prema dobivenim rezultatima razgradnja BPA, početne koncentracije 15 mg dm⁻³, *Pseudomonas aeruginosa* BSW se najbolje odvija pri temperaturi od 35°C, pH-vrijednosti 7 i optičkoj gustoći od 0,3. *Streptomyces* sp. se najviše BPA razgradilo pri temperaturi od 35°C, pH-vrijednosti 7 i optičkoj gustoći 0,2. Pri ispitivanju utjecaja različitih početnih koncentracija BPA na njegovu biorazgradnju, *Pseudomonas aeruginosa* BSW pokazala je najbolje rezultate pri početnoj koncentraciji BPA od 5 mg dm⁻³, a *Streptomyces* sp. pri 7,5 mg dm⁻³. U vremenu od dva sata razgradilo se 50 % BPA, a najintenzivnija biorazgradnja je bila unutar 30 minuta.

Ključne riječi: bisfenol A, biorazgradnja, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* sp., plastika

ABSTRACT

Antonija Kovačević, Ema Lovrinčić

Biodegradation of bisphenol A in water

Bisphenol A (BPA) is ubiquitous organic compound which is present in polycarbonates, epoxy resins and various other materials manufacture. Polycarbonates are used for food and beverage packaging, baby bottles, kitchen tools, medicine packaging and electronic components. Epoxy resins are used for paint, metal food cans, wine barrels and dental equipment. Release of BPA in environment can occur during chemical manufacture, transport, processing and improper disposal of the products which contains it. BPA is interesting because it has toxic environmental impact. More important is its harmful impact on human health and animal world and because of that BPA has to be removed. In water systems, biodegradation of BPA occurs with several microorganisms capable of biodegradation.

In this paper was conducted biodegradation of BPA in water with different bacterial cultures *Pseudomonas aeruginosa* BSW, *Pseudomonas putida* and *Streptomyces* sp. in batch conditions. *Pseudomonas aeruginosa* BSW and *Pseudomonas putida* are isolated from biowaste and active sludge. They have the ability to degrade toxic organic compounds. *Streptomyces* sp. which can be found in the soil, also has the ability to degrade organic compounds.

Experiments were performed under different pH-values (5, 6, 7), temperatures (25, 35 and 40°C), different BPA concentration (0 - 15 mg dm⁻³) and different biomass concentration of *P. aeruginosa* BSW and *Streptomyces* sp. (0,1; 0,2; 0,3).

According to the experimental results the highest amount of BPA (initial concentration 15 mg dm⁻³) was degraded by *Pseudomonas aeruginosa* BSW at 35°C, pH-value 7 and at optical density of 0,3. *Streptomyces* sp. degraded most BPA at 35°C, pH-value 7 and at optical density of 0,2. Among various initial BPA concentrations, *Pseudomonas aeruginosa* BSW showed the best results at initial BPA concentration of 5 mg dm⁻³ and *Streptomyces* sp. at 7,5 mg dm⁻³. During two hours 50 % of BPA was biodegraded and the most intensive biodegradation was within 30 minutes.

Key words: bisphenol A, biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* sp., plastic

ZAHVALE

Veliko hvala našoj mentorici dr.sc. Dajani Kučić Grgić na omogućenoj prilici i ukazanom povjerenju. Hvala na pruženoj pomoći, motivaciji, svakom savjetu, stručnom mentorstvu i pozitivnom stavu prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujemo se svim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na omogućenom radu u laboratoriju i ugodnoj atmosferi.

Hvala našim obiteljima, dragim ljudima, Lovri i Toniju na razumijevanju, strpljenju i bezuvjetnoj podršci.

ŽIVOTOPIS

Antonija Kovačević, rođena 22. rujna 1994. godine u Zagrebu. Svoje obrazovanje započinje u Osnovnoj školi Dugo Selo te ga nastavlja upisom u opću gimnaziju "Tituš Brezovački" u Zagrebu. Sa položenom državnom maturom, 2015. godine upisuje se na preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu preddiplomskog studija odradila je u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" na Zavodu za kliničku mikrobiologiju (odjel za virusologiju) pod vodstvom doc.dr.sc. Oktavije Đaković Rode.

Ema Lovrinčić, rođena 22. ožujka 1995. godine u Puli. Svoje obrazovanje započinje u Osnovnoj školi Vidikovac te ga nastavlja upisom u opću gimnaziju, Gimnaziju Pula. U listopadu 2011. godine sudjeluje na 68. međunarodnom zasjedanju Europskog parlamenta mladih kao vanjski suradnik. Godine 2012. u Labinu sudjeluje u Školi demokracije – Vijeća mladih. Studiranje započinje upisom na preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.