

Procjena ekotoksičnosti cijanida na zelenu algu i bakteriju

Dragun, Donna Danijela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:077678>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Donna Danijela Dragun

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Donna Danijela Dragun

Predala je izrađen diplomski rad dana: 29. kolovoza 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Martina Miloloža, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 3. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Donna Danijela Dragun

PROCJENA EKOTOKSIČNOSTI CIJANIDA NA ZELENU ALGU I BAKTERIJU

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
2. dr. sc. Martina Miloloža
3. dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, rujan 2024.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na prihvaćenom mentorstvu, konstruktivnim sugestijama, stručnim savjetima i praćenju cjelokupnog procesa. Također, zahvaljujem asistentici dr. sc. Martini Miloloži na pomoći, strpljenju, savjetima i prenesenom znanju tijekom provedbe rada.

Hvala svim dragim prijateljima i kolegama, koji su mi bili pomoć i podrška tijekom studija.

A najveće hvala mojoj obitelji – sestri Petri, roditeljima Zvonimiru i Jasminki, baki Marici i Mari, bratiću Igoru, teti Jadranki i tetku Milanu te Jošku Braoviću, koji su uvijek uz mene, potiču me, savjetuju, pomažu i motiviraju za rad na sebi i svom školovanju.

SAŽETAK

Cijanidi su spojevi često korišteni u raznim industrijskim procesima kao što su rudarstvo i koksna industrija. Ispuštanjem otpadnih voda ulaze u okoliš, čime predstavljaju značajnu prijetnju vodenim ekosustavima. Jednom kada dospiju u vodene organizme, cijanidi pokazuju visoku toksičnost za žive organizme, ometajući stanično disanje i dovodeći do ozbiljnih ekoloških i zdravstvenih rizika. Zbog njihovih toksičnih učinaka, ključno je ukloniti cijanide iz onečišćene vode kako bi se zaštitili okoliš i ljudsko zdravlje. Uklanjanje cijanida iz voda može se učinkovito postići raznim kemijskim i fizikalnim metodama obrade voda, uključujući kloriranje i ozonizaciju te raznim biološkim metodama. Biološke metode predstavljaju održiv i ekološki prihvatljiv pristup, koristeći metaboličke sposobnosti mikroorganizama za razgradnju cijanida. Za određivanje potrebe provođenja određene metode, od velike su važnosti testovi ekotoksičnosti. Testovima ekotoksičnosti određuju se minimalne prihvatljive koncentracije tvari u ekosustavima, pri kojima tvari nemaju štetan učinak. Provođeni su ispitivanjima na testnim organizmima u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. U ovom radu testovi ekotoksičnosti provedeni su koristeći dva testna organizma – bakteriju *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp. Određena je CFU vrijednost, inhibicija rasta te EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti. Dobiveni rezultati ukazuju na visoku osjetljivost oba testna organizma na prisutnost cijanida, potvrđujući njihovu prikladnost za procjenu štetnih učinaka.

Ključne riječi: cijanidi, test ekotoksičnosti, bakterija *Pseudomonas putida*, mikroalga *Chlorella* sp.

Estimation of ecotoxicity of cyanide on green microalgae and bacteria

ABSTRACT

Cyanides are compounds commonly used in various industrial processes such as mining and coke production. When released into the environment through wastewater discharge, they pose a significant threat to aquatic ecosystems. Once they enter aquatic organisms, cyanides exhibit high toxicity, disrupting cellular respiration and leading to severe ecological and health risks. Due to their toxic effects, it is crucial to remove cyanides from contaminated water to protect the environment and human health. Cyanide removal from water can be effectively achieved through various chemical and physical water treatment methods, including chlorination and ozonation, as well as various biological methods. Biological methods represent a sustainable and environmentally friendly approach, utilizing the metabolic capabilities of microorganisms to degrade cyanides. Ecotoxicity tests are of great importance for determining the necessity of a particular method. Ecotoxicity tests determine the minimum acceptable concentrations of substances in ecosystems at which they do not have harmful effects. These tests are conducted on test organisms under controlled laboratory conditions.

In this study, ecotoxicity tests were conducted using two test organisms – the bacterium *Pseudomonas putida* and the microalga *Chlorella sp.* The CFU (colony-forming units) value, growth inhibition, and EC₂₀ and EC₅₀ values were measured. The obtained results indicate a high sensitivity of both test organisms to the presence of cyanides, confirming their suitability for assessing harmful effects.

Keywords: cyanides, ecotoxicity test, bacterium *Pseudomonas putida*, microalga *Chlorella sp.*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. CIJANIDI	2
2.1.1. Fizikalno – kemijska svojstva cijanida.....	2
2.1.2. Izvori i primjena cijanida	3
2.1.3. Toksični učinak cijanida	4
2.1.4. Obrada otpadnih voda s ciljem uklanjanja cijanida	8
2.2. ISPITIVANJE EKOTOKSIČNOSTI CIJANIDA	9
2.2.1. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanida na <i>Daphnia magna</i>	9
2.2.2. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanida na <i>Oryzias latipes</i>	10
2.2.3. Ispitivanje toksičnosti cijanida na mikroalgu <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	11
2.3. BAKTERIJA <i>Pseudomonas putida</i>	11
2.3.1. Svojstva bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	11
2.3.2. Primjena bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	12
2.3.3. Ekotoksičnost cijanida na bakteriju <i>Pseudomonas putida</i>	14
2.4. MIKROALGA <i>Chlorella</i> sp.	15
2.4.1. Svojstva mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	15
2.4.2. Primjena mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	17
2.4.3. Ekotoksičnost cijanida na mikroalgu <i>Chlorella</i> sp.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Materijali	21
3.1.1. Cijanidi	21
3.1.2. Mikroorganizmi.....	21
3.2. Mediji i kemikalije	22
3.2.1. Mineralni medij	22
3.2.2. Fiziološka otopina	23
3.2.3. Hranjivi agar.....	23
3.2.4. Bazalni medij.....	23
3.3. Mjerni instrumenti i oprema.....	23
3.4. Metoda rada.....	24
3.4.1. Priprema otopine cijanida.....	24
3.4.2. Uzgajanje bakterijske kulture <i>Pseudomonas putida</i>	24
3.4.3. Uzgajanje kulture mikroalge <i>Chlorella</i> sp.....	25
3.5. Provedba testova ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	25

3.6. Provedba testova ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Rezultati testa ekotoksičnosti s bakterijom <i>Pseudomonas putida</i>	28
4.1.1. Promjena CFU vrijednosti.....	28
4.1.2. Inhibicija rasta bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	33
4.1.3. Procjena EC ₂₀ i EC ₅₀ vrijednosti	35
4.2. Rezultati testa ekotoksičnosti s mikroalgom <i>Chlorella</i> sp.	36
4.2.1. Promjena CFU vrijednosti.....	36
4.2.2. Inhibicija rasta mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	40
4.2.3. Procjena EC ₂₀ i EC ₅₀ vrijednosti	42
4.3. Usporedba rezultata.....	43
5. ZAKLJUČAK	44
6. POPIS OZNAKA I SIMBOLA	45
7. LITERATURA	46
8. ŽIVOTOPIS	52

1. UVOD

Cijanidi su skupina kemijskih spojeva koji sadrže cijanidnu skupinu (-CN). Visoke su toksičnosti za ljude i druge organizme, uglavnom djelujući na dišni sustav, pri čemu mogu uzrokovati smrt u dovoljno visokim koncentracijama. [1] Cijanidi se često nalaze u industrijskim procesima rudarstva i kemijske proizvodnje, gdje se koriste u procesima poput ekstrakcije zlata, završne obrade metala, proizvodnje plastike, koksa i sintetičkih vlakana. [2] Jedna od glavnih briga u vezi s cijanidima je njihova mogućnost onečišćenja vodenih izvora, do čega može doći na različite načine, uključujući industrijske ispušne plinove, izljeve otpadnih voda ili nepravilno odlaganje otpada. Dolaskom u vodu, cijanidi mogu predstavljati ozbiljne rizike za živi svijet u vodi te također mogu onečistiti izvore pitke vode, tako ugrožavajući ljudsko zdravlje. [3] Otkrivanje cijanida u vodi ključno je za osiguravanje sigurnosti vode te zaštite okoliša i živih organizama. Testovi ekotoksičnosti eksperimentalni su postupci kojima se procjenjuje štetan učinak tvari na ekološke sustave, osobito žive organizme. Ključni su za razumijevanje kako onečišćujuća tvar utječe na okoliš. Testovi ekotoksičnosti obično uključuju izlaganje testnih organizama različitim koncentracijama ispitivane tvari te promatranje njihova štetna učinka. [4]

Cilj ovoga rada je pomoću testova ekotoksičnosti odrediti štetni učinak cijanida, korištenjem mikroalge *Chlorella* sp. i bakterije *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas putida* je gram – negativna bakterija poznata po svojoj sposobnosti prilagodbe različitim okolišnim uvjetima i razgradnji širokog spektra spojeva. Često se koristi u bioremedijaciji, procesu koji koristi mikroorganizme za uklanjanje toksičnih tvari iz okoliša, zbog svojih učinkovitih metaboličkih puteva i otpornosti na stresne uvjete. [5] *Chlorella* sp. rod je jednostaničnih zelenih mikroalgi. Poznata je po brzom rastu i viskom sadržaju klorofila. Zbog svoje jednostavne strukture i brze reprodukcije, mikroalga *Chlorella* sp. se često koristi u ekotoksikološkim istraživanjima, bioremedijaciji te u proizvodnji biogoriva i dodataka prehrani. [6] Otpornost na nepovoljne uvjete i sposobnost prilagodbe različitim okolišnim parametrima čine ju idealnim organizmom za proučavanje utjecaja toksičnih tvari. Testovi ekotoksičnosti provedeni su pri 6 različitih koncentracija cijanida u trajanju od 72 h uz podešavanje pH – vrijednosti, optičke gustoće i broja okretaja tresilice. Određene su CFU vrijednosti, postotak inhibicije rasta testnih organizama te vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ na temelju kojih su doneseni zaključci o ekotoksičnosti cijanida. Provođenjem istraživanja o ekotoksikološkom utjecaju cijanida u vodama, cilj ovog rada je pridonijeti vrijednim uvidima za očuvanje okoliša.

2. OPĆI DIO

2.1. CIJANIDI

2.1.1. Fizikalno – kemijska svojstva cijanida

Cijanidi su skupina kemijskih spojeva koji sadrže cijanidni ion (CN^-), sastavljen od atoma ugljika povezanog trostrukom vezom s atomom dušika (slika 1.). [3]

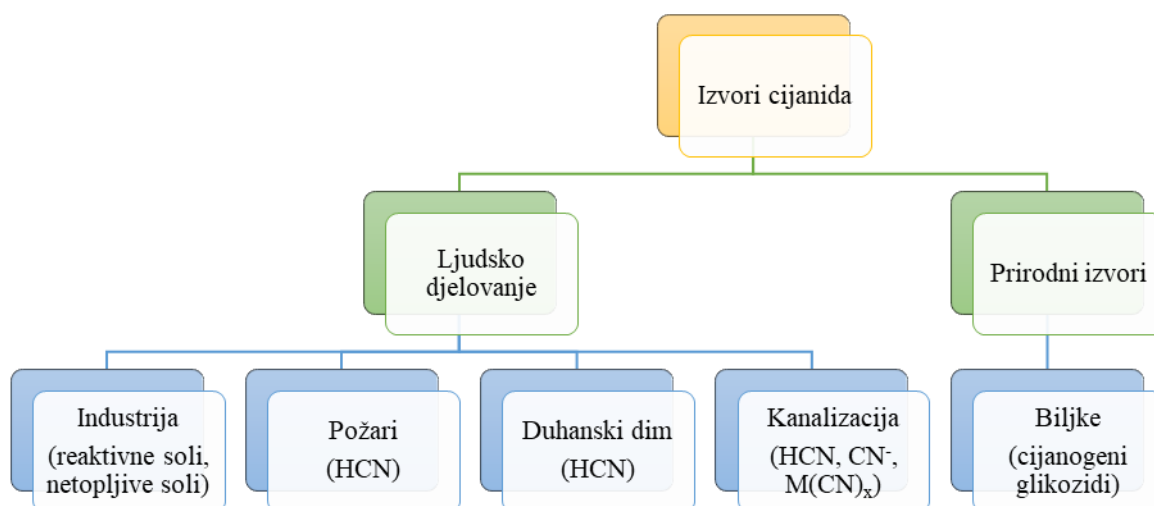


Slika 1. Cijanidni ion prikazan Lewisovom strukturnom formulom. [3]

Spojevi cijanida visokog su stupnja reaktivnosti i dobro su poznati po svojim toksičnim svojstvima. Cijanidi mogu postojati u različitim oblicima, od kojih je najosnovniji, ali i najtoksičniji vodikov cijanid (HCN). Vodikov cijanid pri sobnoj je temperaturi bezbojan plin topljiv u vodi, blagog i gorkog mirisa badema. [1] U vodi se disocira na vodikov kation i cijanidni anion. Međutim, pri pH vrijednostima višim od 8, cijanidi postoje u vodi kao HCN, što je štetnije za vodeni ekosustav, nego slobodni cijanidni ion. Gori prilikom izlaganja plamenu ili oksidansima. Cijanidni ioni sliče halogenidnim ionima prema određenim svojstvima, pa se ponekad nazivaju "pseudohalogenidnim" ionima. [1,7] Srebrov cijanid, poput srebrovih halogenida, gotovo je netopljiv u vodi. Ioni cijanida tvore stabilne komplekse s mnogim metalima, kao što su cink, željezo i bakar. Iako se KCN i NaCN lako disociraju na CN^- ione i HCN pri neutralnoj pH – vrijednosti, metalo-cijanidni kompleksi pokazuju širok raspon kemijske i biološke stabilnosti. [7] Na primjer, natrijev cijanid (NaCN) široko je korišten za ekstrakciju zlata i srebra iz njihovih ruda, prilikom čega procesi uključuju formiranje kompleksnih cijanida. [1] Cijanidi također tvore i organske spojeve u obliku nitrila poput akrilonitrila, ili propionitrila. [7] Svi oblici cijanida mogu biti otrovni u visokim razinama, ali vodikov cijanid smatran je najsmrtonosnijim oblikom. Pri kratkotrajnom izlaganju uzrokuje drhtanje i druge neurološke učinke, dok dugotrajna izloženost vodikovom cijanidu ima štetan učinak na štitnjaču, oštećuje živce i u konačnici može uzrokovati smrt. Dodir kože s tekućinama koje sadrže cijanide može izazvati iritaciju i crvenilo kože. [8]

2.1.2. Izvori i primjena cijanida

Dok su prirodno prisutni u određenim biljkama i sjemenkama, kao što su grah, orašasti plodovi, mango i uljana repica, gdje im je glavna uloga zaštita od biljojeda, prisutni su i u fotosintetskim bakterijama, algama, gljivama, te čak i u životinjskom svijetu. Posjeduju ga gusjenice, kukci i nekoliko vrsta leptira. [7,9,10] Međutim, industrijske aktivnosti i druge ljudske aktivnosti značajno doprinose otpuštanju cijanida u okoliš. Godišnja potrošnja cijanida u svijetu iznosi oko 1,1 milijun tona, što je značajan pokazatelj velike potražnje i široke uporabe. [10] Prisutni su u zraku, tlu i vodi. Glavni oblik cijanida prisutan u zraku je HCN, dobiven kao produkt izgaranja sintetičkih polimera, vune i svile. Također je proizveden tijekom izgaranja goriva u automobilskim motorima kao rezultat katalitičke redukcije dušikovih oksida te je produkt duhanskog dima. [2] Cijanidi mogu ući u površinske vode ispuštanjem otpada završne obrade metala, željeza i čelika, otjecanjem s odlagališta otpada cijanida, pesticidima i korištenjem cestovnih soli koje sadrže cijanide. [7] Primjeri izvora emisije spojeva cijanida prikazani su slikom 2.



Slika 2. Shematski prikaz prirodnih izvora spojeva cijanida i spojeva cijanida dobivenih ljudskim djelovanjem. [3]

U industrijskom kontekstu, glavni izvori cijanida uključuju metalurške procese, elektroplatanje, rudarske aktivnosti i proizvodnju određenih kemikalija. [2] Unutar koksne industrije, cijanidi su posebno relevantni zbog njihove formacije tijekom visokotemperaturne karbonizacije ugljena u koksnim pećima. Dušikom sadržani spojevi u ugljenu, poput piridina, podvrgavaju se kemijskim reakcijama pri povišenim temperaturama tijekom karbonizacije ugljena. Te reakcije rezultiraju otpuštanjem vodikovog cijanida i drugih spojeva cijanida. [11] Tiocijanat (SCN) jedna je od najvažnijih cijanidnih kompleksnih vrsta prisutnih u industrijskim

otpadnim vodama, pa tako i u koksnoj industriji, gdje je prisutan u koncentracijama do 1500 mg/L SCN. [11,12] Industrijski otpadni vodovi općenito sadrže između 0,01 i 10 mg/L ukupnog cijanida, ali otpadni cijanidi iz pojedinih operacija procesa mogu biti pohranjeni godinama, nakon čega otpadna voda može sadržavati i od 30000 mg/L cijanida. [11] Cijanidni ioni u tlu uglavnom su prisutni djelovanjem antropogenih manifestacija poput galvanske i metalurške industrije. Otpad koji sadrži visoke koncentracije cijanida također se proizvodi tijekom podzemne pirolize ugljena, čime se uvodi u tlo. [11,13]

2.1.3. Toksični učinak cijanida

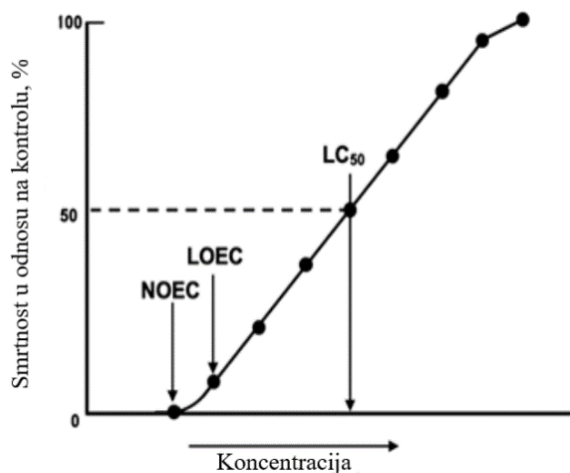
Cijanidi predstavljaju značajne rizike za okoliš i žive organizme zbog visoke toksičnosti i potencijala za bioakumulaciju. Izloženost cijanidima u vodenim ekosustavima može rezultirati nepoželjnim učincima na ribe, beskralješnjake i vodene biljke. [14] Oni ometaju stanično disanje inhibicijom citokroma oksidaze i time uzrokuju hipoksiju, što može dovesti do srčanih problema organizama i u konačnici smrti. [4,15] Osim citokroma oksidaze, cijanidni ioni inhibiraju i normalan rad niza drugih enzima među kojima su ksantin oksidaza, superoksid dismutaza i slično. Peroksidacijom lipida organizama cijanidni anion uzrokuje oštećenja živčanog sustava. [9] Ekološke posljedice onečišćenja cijanidima uključuju pomore riba, smanjenje bioraznolikosti i dugotrajne poremećaje ekosustava. Utjecaj prisutnosti različitih spojeva cijanida na niz vrsta vodenih organizama prikazani su tablicom 1.

Tablica 1. Oblici cijanida i njihova koncentracija u vodenim organizmima nakon određenog vremena izlaganja. [9]

Organizam	Kemijski spoj	Parametar/vrijeme izlaganja	Koncentracija
<i>Daphnia magna</i>	NaCN	LC ₅₀ /24h	0,171 mg/L
<i>Pimephales promelas</i>	HCN	NOEC-LOEC/256 dana	12,9–19,6 µg/L
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	K ₃ Co(CN) ₆	LC ₅₀ /96h	112,9 mg/L
<i>Chlamys asperrimus</i>	K ₃ Fe(CN) ₆	EC ₅₀ /48h	0,128 mg/L
<i>Cyprinus carpio</i>	NaCN	LC ₅₀ /96h	1,0 mg/L

Parametri koji su pri tome korišteni su LC₅₀, NOEC, LOEC i EC₅₀ u različitom vremenu izlaganja. LC₅₀ predstavlja koncentraciju tvari u okolišu koja je smrtonosna za 50 % testiranih organizama unutar određenog vremenskog razdoblja. Često se izražava koncentracijom u zraku,

vodi ili tlu. [16,17] U slučaju *Daphnia magna*, učinak cijanida vidljiv je već pri koncentracijama od 0,171 mg/L. [9] EC_{50} je sličan LC_{50} , ali se koristi šire kako bi predstavio koncentraciju tvari koja izaziva određeni učinak kod 50 % testiranih organizama, ne nužno smrtonosnost. Taj učinak može biti, primjerice smanjenje rasta, reprodukcije ili neka druga biološka promjena. [17] Za školjku *Chlamys asperrimus* iznosi čak 0,128 mg/L. [9] NOEC je najviša koncentracija tvari pri kojoj se ne primjećuju statistički značajni štetni učinci na testiranom organizmu tijekom određenog vremena izloženosti. Važan je parametar u ekotoksikološkim istraživanjima jer pomaže identificirati prag na kojem ispitivana tvar nema vidljiv štetni učinak. LOEC je najniža koncentracija tvari pri kojoj se primjećuju statistički značajni štetni učinci na testiranom organizmu tijekom određenog vremena izloženosti i koristi se kako bi se odredila najniža razina na kojoj postaju vidljivi štetni učinci. [16] Slikom 3. predočena je ovisnost postotka smrtnosti o koncentraciji tvari, pri čemu su naznačeni opisani parametri.



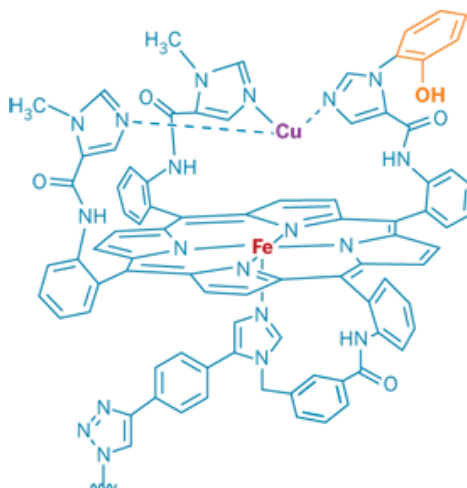
Slika 3. Krivulja vrijednosti NOEC, LOEC i LC_{50} . [17]

Toksičnost doze uglavnom ovisi o vrsti spoja koji sadrži cijanidni ion. Iz tablice je vidljivo da već vrlo niske koncentracije spojeva cijanida predstavljaju opasnost pa čak i smrtonosnost za mnoge organizme. Najmanju toksičnost pokazuju kompleksni spojevi cijanida. [9] Upravo je zato važno uočiti prisutnost cijanida u što nižim koncentracijama. Fizikalno – kemijske metode praćenja koncentracija cijanida uključuju kolorimetrijske i spektrofotometrijske analize, plinsku kromatografiju i ion-selektivne elektrode. [4,9] Tablica 2. prikazuje koncentracije cijanida u različitim vrstama voda.

Tablica 2. Koncentracije cijanida u različitim vodama. [9]

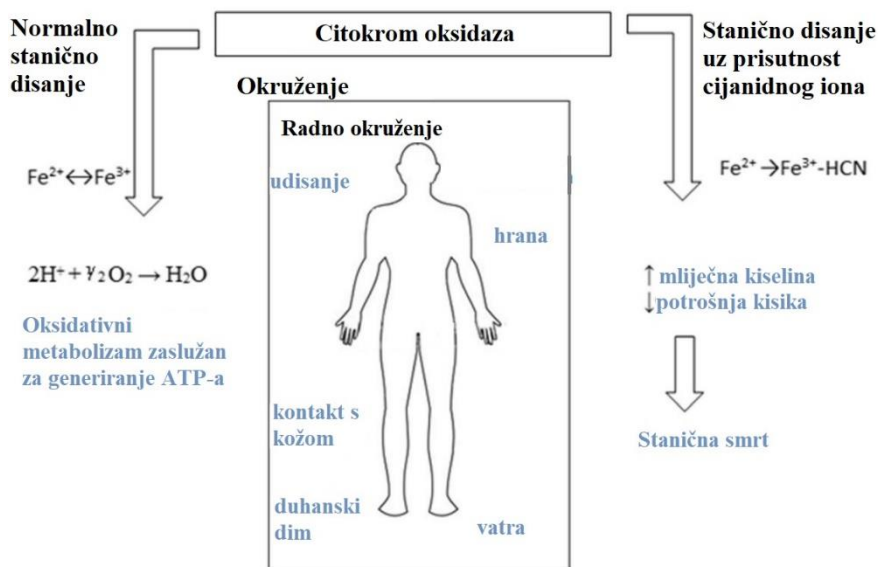
Vrsta vode	Izvor/zemlja	Koncentracija cijanida
Otpadna voda	Otpad od zlatnih ruda/Iran	540 mg/L
	Otpad od elektropliranja (2007)/Iran	0,04–1,2 µg/mL
	Petrokemijski mulj (2010)/Iran	4600,2 µg/L
Površinska voda	Rijeka Gum/J. Koreja	1,01 ± 0,03 µg/L
	-/Brazil	25–50 µg/L
Vodovodna voda	-/Iran	0,6 µg/L
Voda za piće	-/USA	<LOD

Osim utjecaja na okoliš, cijanidi mogu predstavljati ozbiljne rizike po zdravlje ljudi. Osnovni princip djelovanja cijanida uključuje reakciju s citokrom oksidazom (slika 4.). Cijanid se veže s trovalentnim željezom citokrom oksidaze, koji je ključni enzim respiratornog lanca. [8]



Slika 4. Strukturna formula citokrom oksidaze. [18]

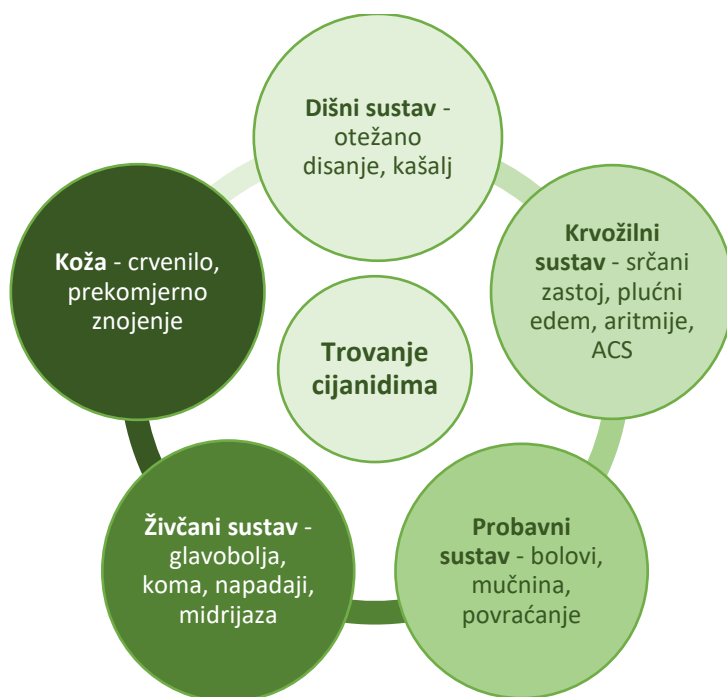
Navedena reakcija rezultira blokiranjem staničnog disanja i povećanjem sinteze mliječne kiseline (slika 5.). Inhalacija plina vodikovog cijanida, ili unos hranom mogu dovesti do respiratornih problema, vrtoglavice i, u ekstremnim slučajevima izloženosti visokim koncentracijama, smrtonosnih ishoda. [8] Zaposlenici izloženi industrijskim procesima u kojima se koriste ili proizvode cijanidi, među kojima su rudari, vatrogasci i radnici u metalurškoj, kemijskoj industriji i galvanskim procesima, izloženi su velikim količinama trovanja cijanidima i moraju primjenjivati stroge sigurnosne mjere kako bi spriječili nepoželjne učinke na zdravlje. Kod ljudi čija radna okruženja nisu izložena cijanidima, najčešći izvor cijanida je duhanski dim. [19]



Slika 5. Shematski prikaz utjecaja cijanida na citokrom oksidazu u ljudskom organizmu.

[9]

Procijenjena smrtonosna doza za odraslog čovjeka iznosi 1,5 mg slobodnog cijanidnog aniona po kilogramu tjelesne težine, dok se simptomi teškog trovanja opažaju pri inhalaciji od 53 mg HCN/m. [3,9] Mogući simptomi trovanja cijanidima i sustavi na koje cijanidi mogu imati utjecaja prikazani su slikom 6. Zbog prepoznatih opasnosti povezanih s cijanidima, praćenje i regulacija bitni su dijelovi upravljanja i zaštite okoliša te zdravlja živih organizama.



Slika 6. Simptomi trovanja cijanidima u različitim sustavima organa ljudskog tijela. [9]

2.1.4. Obrada otpadnih voda s ciljem uklanjanja cijanida

Vode koje sadrže cijanide često se obrađuju alkalnim kloriranjem ili biološkim oksidacijskim procesima. Ovi procesi su učinkoviti samo za slobodne cijanide i cijanide koji su slabo vezani za metale. [20] Cijanidi koji su snažno vezani ili kompleksirani s metalima ne mogu se obraditi ovim metodama. Najčešće korištena metoda za obradu otpadnih voda koje sadrže cijanide je kemijski oksidacijski postupak, poput alkalno – klorinacijsko – oksidacijskog procesa. [21] Navedenom se metodom otpad koji sadrži cijanide prvo obraditi klorom ili hipokloritom, kako bi se sintetizirao međuprodukt cijanogen klorid, odnosno suzavac, koji zatim katalizira reakciju i nastaje znatno manje toksični spoj natrijev cijanat. Danjim kloriranjem cijanat se oksidira do ugljičnog dioksida i dušika. [21,22] Otpadne vode koje sadrže cijanide mogu se obraditi metodom ozonizacije, koja uključuje bakrom kataliziranu oksidaciju vodikovim peroksidom, elektrolitičku razgradnju i slično. [21] Najčešći fizikalni proces za uklanjanje cijanida iz otpadnih voda je adsorpcija. Iako se kemijski i fizički procesi mogu koristiti za razgradnju cijanida i povezanih spojeva, često su prisutni veliki troškovi i procesi provođenja su kompleksni. Alternativa fizikalno – kemijskim procesima je biološka obrada, koja obično ovisi o prilagodbi i potrebnim uvjetima za korištene mikroorganizme. Biološka razgradnja cijanida često se nudi kao metoda s nižim troškovima i ekološki prihvatljiva alternativa konvencionalnim procesima. Biološka razgradnja je proces razgradnje i transformacije opasnih tvari u jednostavne, netoksične tvari biološkim metodama, odnosno djelovanjem mikroorganizama. [23] Neke bakterije, gljivice, alge i biljke mogu razgraditi cijanide i spojeve cijanida. Proces koji zahtijeva prisutnost kisika naziva se aerobna biodegradacija, dok je proces koji se odvija u odsutnosti kisika anaerobna biodegradacija. [22] Mikroorganizmi koji su primarno odgovorni za razgradnju cijanida uključuju raznoliku skupinu anaerobnih i aerobnih bakterija. Ovi jednostanični mikroorganizmi pokazuju širok raspon metaboličkih funkcija i sposobni su razgraditi brojne kemijske strukture, širokog raspona koncentracija. [22] Bakterije koriste ekstracelularne i intracelularne enzime u biokemijskoj razgradnji te asimilaciji organskih i anorganskih spojeva prisutnih u kapljevitom otpadu. Takvi se spojevi razgrađuju i/ili asimiliraju u svrhu proizvodnje energije i sinteze stanica. Ekstracelularni enzimi prisutni u staničnoj stijenci, ili u kapsulnom sloju oko stanične stijenke razgrađuju veće i složenije molekule, pretvarajući ih u manje, topljive nusprodukte. Razgrađeni produkti potom se transportiraju u bakterijsku stanicu, radi pretvorbe u stanični materijal i energiju uz pomoć intracelularnih enzima. [23]

2.2. ISPITIVANJE EKOTOKSIČNOSTI CIJANIDA

Ekotoksikologija je znanost koja se bavi proučavanjem učinaka onečišćujućih tvari na sastavnice biosfere, uključujući ljude. Integrira toksikologiju i ekologiju kako bi provela donošenje odluka o mogućim utjecajima štetnih ispitivanih tvari prisutnih u okolišu na pojedine sastavnice ekosustava. [16,25] Obuhvaća laboratorijska ispitivanja, odnosno testove ekotoksičnosti, kojima se ispituju utjecaji pojedinih tvari na izabrane testne organizme u kontroliranim laboratorijskim uvjetima te njihovo podvrgavanje na uvjete prisutne u stvarnim ekosustavima. [16,17] Njihov cilj je provesti uspostavu odgovarajućih smjernica za minimalno prihvatljive koncentracije ispitivane tvari. Stvarni uvjeti u ekosustavima su često nejasni, dinamični i nepredvidljivi. Iako se nastale promjene mogu detektirati i kvantificirati usprkos kompleksnim pozadinskim smetnjama izazvanim drugim uzrocima, često je teško pripisati te promjene određenoj ispitivanoj tvari. Istraživanja koja kombiniraju podatke iz laboratorijskih testova s podacima iz testova provođenim u stvarnim uvjetima, pružaju najvjerođostojniji učinak ispitivane tvari na testnim organizmima. [25] Ispitivanja ekotoksičnosti različitih spojeva cijanida provedena su na nizu testnih organizama, a njihov učinak znatno ovisi o koncentraciji i vrsti spojeva cijanida te trajanju izloženosti organizama ispitivanim uvjetima i njihovoj vrsti.

2.2.1. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanida na *Daphnia magna*

Daphnia magna mala je vodenbuha, veličine 2 – 5 mm (slika 7.). Široko je rasprostranjen u različitim slatkovodnim staništima, uključujući ribnjake i jezera, gdje ima značajnu ulogu u vodenim ekosustavima. [26] Često se koristi kao modelni organizam u ekotoksikologiji, zbog svoje osjetljivosti na okolišne stresore i toksične učinke tvari. [27]



Slika 7. Mikroskopska slika organizma *Daphnia magna*. [28]

Test akutne toksičnosti cijanida na testnom organizmu *Daphnia magna* proveden je u trajanju od 48 h. Korišteno je 6 različitih koncentracija cijanida i rezultati su prikupljeni prilikom postavljanja eksperimenta te nakon 24. h i 48. h. Tijekom izlaganja testnog organizma cijanidima tijekom 24 h, došlo je do oštećenje plivanja svih jedinki pri koncentracijama većim od 0,61 mg/L, dok je pri koncentracijama većim od 0,15 mg/L preko 25 % jedinki pokazalo otežanu mogućnost plivanja. Na temelju rezultata eksperimenta, dobiven je iznos EC_{50} od 0,21 mg/L, dok su minimalne koncentracija bez vidljivog učinka, NOEC, i minimalna koncentracija s vidljivim učinkom cijanida, LOEC, iznosile 0,06 mg/L, odnosno 0,15 mg/L. [29]

2.2.2. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanida na *Oryzias latipes*

Oryzias latipes, poznata kao japanska rižina riba, živi u slatkim i slanim vodenim prostorima tijekom svojega života (slika 8.). Endem je Istočne Azije, posebno Japana, Koreje, Kine i Vijetnama. [30] Poznata je po svojoj važnosti u znanstvenim istraživanjima, osobito kao biološki pokazatelj ispravnosti vodenih ekosustava. [31]



Slika 8. Riba *Oryzias latipes*. [32]

Ispitivanje akutne toksičnosti cijanida na ribe provedeno je eksperimentom na testnom organizmu *Oryzias latipes* u trajanju od 96 h. Ispitivanje je provedeno na 6 različitih koncentracija cijanida, a podaci su prikupljeni prilikom postavljanja eksperimenta, nakon 24. h, 48. h, 72. h i 96. h. Već nakon 24 h uočena su abnormalna ponašanja riba, kao što su ležanje na boku, ili plivanje na leđima. Smrtnost nije uočena tijekom eksperimenta, ali navedena abnormalna ponašanja u konačnici su se razvila u smrtnost. EC_{50} i LC_{50} vrijednosti bile su manje od 1,0 mg/L, pokazujući da čak i male količine cijanida mogu izazvati akutne štetne učinke na vodene organizme. Također, minimalna opažena koncentracija s učinkom (LOEC)

bila je manja od 0,6 mg/L, što ukazuje na visok potencijal razvitka kroničnih štetnih učinaka na okoliš i prisutne organizme. [29]

2.2.3. Ispitivanje toksičnosti cijanida na mikroalgu *Pseudokirchneriella subcapitata*

Pseudokirchneriella subcapitata vrsta je zelene mikroalge (slika 9.). Jednostanični je organizam i često se koristi u ekotoksikologiji te za praćenje okoliša kao standardni testni organizam za procjenu učinaka toksičnih tvari na vodene ekosustave, kao bioindikator. [33]



Slika 9. Mikroskopska slika mikroalge *Pseudokirchneriella subcapitata*. [34]

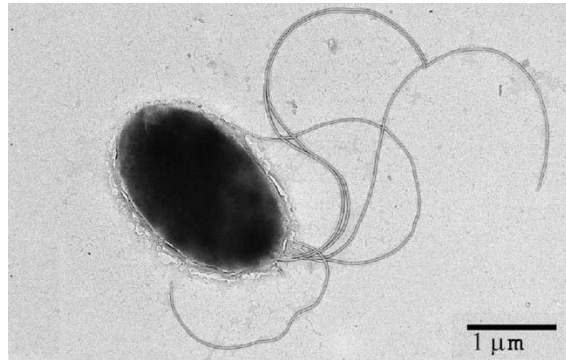
Test inhibicije rasta slatkovodnih mikroalgi proveden je tijekom 72 h na testnom organizmu mikroalgi *Pseudokirchneriella subcapitata*. Eksperiment je proveden na 6 različitih koncentracija bakrovog (I) cijanida. Koncentracija bakra u svim uzorcima testne otopine analizirana je na početku i na kraju eksperimenta, koristeći masenu spektrometriju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Uzorci su uzimani nakon 24 h, 48 h i 72 h. Uočena je značajna inhibicija stope rasta mikroalgi *Pseudokirchneriella subcapitata* ovisno o koncentraciji ispitne tvari. Procijenjene su vrijednosti od maksimalne inhibicije rasta mikroalgi u iznosu od 50 % u uzorku s najvećom korištenom koncentracijom cijanida od 100 mg/L. Koncentracija pri kojoj nema vidljivog učinka (NOEC) iznosila je 0,018 mg/L, a minimalna koncentracija pri kojoj je učinak vidljiv (LOEC) za razdoblje od 72 h iznosila je 0,042 mg/L. [29]

2.3. BAKTERIJA *Pseudomonas putida*

2.3.1. Svojstva bakterije *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida je metabolički svestrana, gram – negativna bakterija štapićastog oblika, prosječne duljine od 0,5 do 1,0 µm (slika 10.). Na vanjskoj površini posjeduje bičeve

koji joj omogućavaju kretanje i fimbrije, kojima se bakterije pričvršćuju na površinu. [35] Karakteristična je po svojoj metaboličkoj raznolikosti i posjeduje sposobnost korištenja različitih izvora ugljika, uključujući različite organske spojeve. Takva metabolička fleksibilnost doprinosi njezinoj prilagodljivosti u raznolikim ekološkim staništima. [36]



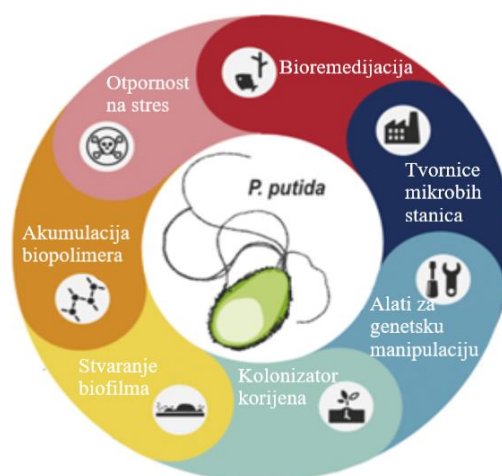
Slika 10. Mikroskopska slika bakterije *Pseudomonas putida*. [37]

Pripada širokoj skupini fluorescentnih bakterijskih vrsta *Pseudomonas*. [5] Karakteristična je po izdržljivosti, nezahtjevnim prehrambenim potrebama, brzom rastu, otpornosti na oksidativni stres i toksične kemikalije. [38,39] Zbog prisutnosti karakterističnih plazmida, otporna je na utjecaje određenih antibiotika. [35] Aerobna je bakterija, što znači da joj je za rast i razvoj potreban kisik. Međutim, zabilježeno je i odvajanje od aerobne prirode, što omogućava procese u bioreaktorima bez aeracije i omogućuje stvaranje prirodnih proizvoda pomoću biokatalizatora osjetljivih na kisik. [40,41] *Pseudomonas putida* najbolje raste u temperaturnom rasponu od 15 do 35 °C pa tako, zbog niske otpornosti na povišene temperature, odnosno temperature iznad 41 °C, nije prisutna u visokotemperaturnim područjima. Optimalna pH vrijednost u neutralnom je području te iznosi 7 – 8. [35] Izolirana je iz vode, korijenja i lišća biljaka ili tla, a kod životinja i ljudi pojavljuje se kao nepatogena vrsta, iako neki sojevi mogu djelovati kao prilagođeni patogeni kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom i novorođenčadi. [35,42]

2.3.2. Primjena bakterije *Pseudomonas putida*

Bakterija *Pseudomonas putida* može služiti u bioremedijaciji, zbog svoje sposobnosti rasta na složenim supstratima. [38] Brojna istraživanja bave se sposobnošću razgradnje onečišćenja korištenjem bakterije *Pseudomonas putida* te mogućnošću njihova iskorištenja, što doprinosi razvoju ekološki prihvatljivijih pristupa pri obradi otpada i otpadnih voda. [43] Mogu biti genetski modificirane te tako izražavaju određene genske oznake ili prolaze kroz fiziološke promjene kao odgovor na onečišćenja u okolišu i djeluje kao biosenzor. [5,39] Sukladno

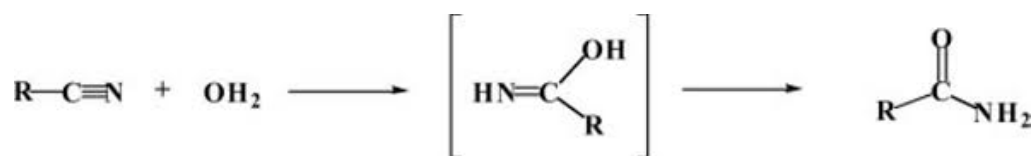
izloženim onečišćenjima, bakterija podliježe reakcijama, poput fluorescencije ili bioluminiscencije, pružajući vidljiv pokazatelj prisutnosti onečišćenja. Biosenzori na bazi bakterije *Pseudomonas putida* pružaju prednost praćenja u stvarnom vremenu, jer se mogu primjenjivati izravno u okolišu. Brzi odgovor ovih biosenzora omogućava trenutno otkrivanje promjena i mogućih onečišćenja. [44] Tijekom posljednjih nekoliko godina *Pseudomonas putida* se pokazala izvrsnim bakterijskim domaćinom za proizvodnju polimera, velikih kemikalija i lijekova. [41] *Pseudomonas putida* ne samo da se koristi za rekombiniranu biosintezu prirodnih produkata, već i sama proizvodi sekundarne metabolite koji su od interesa za biotehnoške primjene. Primjerice, proizvodi polimere alginat i polihidroksialkanoate (PHA). Navedeni spoj posebno je zanimljiv zbog svojih fizičkih i materijalnih svojstava te se istražuje kao alternativa konvencionalnim polimerima u biotehnoškoj industriji. [40,41,45] Bakterija pronalazi svoju ulogu i u poljoprivredi pa tako može utjecati na rast biljaka. *Pseudomonas putida* može reagirati s biljkama na način da potiče njihov rast te povećava otpornost na bolesti i okolišne stresove. Navedeno je moguće jer *Pseudomonas putida* proizvodi antimikrobne spojeve poput antibiotika i litičkih enzima, koji inhibiraju rast biljnih patogena. Ti spojevi pomažu u zaštiti biljaka od bolesti tako što suzbijaju proliferaciju štetnih mikroba u rizosferi i na površinama biljaka. [35,41] Koristi se kao biofertilizator s obzirom da poboljšava topljivost hranjivih tvari poput fosfora i željeza, čineći ih dostupnijima biljkama. [46,47] Navedeno poboljšava apsorpciju hranjivih tvari od strane biljaka, što pak potiče njihov rast i razvoj. Osim toga, bakterija može fiksirati atmosferski dušik, pružajući dodatni izvor hranjivih tvari biljkama. [47] Slikom 11. predočeno je nekoliko opisanih primjena i karakteristika svojstvenih bakteriji *Pseudomonas putida*.



Slika 11. Neke od poznatih primjena i svojstava bakterije *Pseudomonas putida*. [5]

2.3.3. Ekotoksičnost cijanida na bakteriju *Pseudomonas putida*

Mnogi mikroorganizmi posjeduju sposobnost prilagodbe različitim okolišnim uvjetima te mogu koristiti onečišćujuće tvari kao izvor nutrijenata razgradnjom ciljanih spojeva. [16] Bakterija *Pseudomonas putida* prepoznata je po sposobnosti razgradnje širokog spektra spojeva, uključujući cijanide. Bakterije koriste specifične metaboličke putove za enzimsku razgradnju cijanida, pretvarajući ih u manje toksične spojeve poput formijata i amonijaka, ili pak izravno stvarajući bikarbonat i amonijak putem cijanid oksidaze ili dioksidogeneze. [49,50] Enzimi kao što su cijanidaza i nitrilaza, koriste se kako bi katalizirali proces razgradnje cijanida i zato imaju ključnu ulogu u detoksikaciji cijanida, čineći ih manje štetnima za okoliš. [51] Česti enzim za degradaciju cijanida bakterijom *Pseudomonas putida* je nitril hidrataza, koja ima željezni ili kobaltni aktivni centar s dva oksidirana cisteinska liganda, cistein – sulfeničnu kiselinu i cistein – sulfeničnu kiselinu. Ligandi prisutni u strukturi enzima kataliziraju reakciju hidratacije nitrila u amide. [52] Reakcijski put enzima u prisutnosti vode prikazan je slikom 12.



Slika 12. Reakcijski put enzima nitril hidrataze u prisutnosti vode pri pretvorbi cijanidnog spoja do izocijanohidrata, sve do amida. [52]

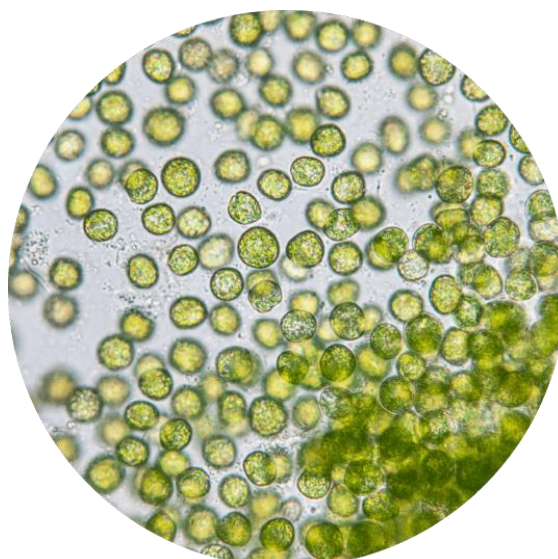
Bakterija *Pseudomonas putida* izolirana je s lokacija onečišćenih lužinama iz koksne peći te je proučavan njezin utjecaj na fenole i cijanide. Utvrđeno je da istovremeno razgrađuje velike količine fenola i cijanida prisutnih u lužini, što rezultira smanjenjem BPK i KPK vrijednosti za više od 50 %. Razgradnja cijanida dodatno je poboljšana jednostavnim postupkom imobilizacije stanica bakterije. Najveća razina biodegradacije cijanida korištenjem imobiliziranih stanica bakterije *Pseudomonas putida* zabilježena je pri pH vrijednosti od 7,5 i temperaturi od 25 °C. Takvi sojevi mogu se koristiti za razvoj mikrobnih tehnologija za bioremedijaciju zemljišta zagađenog industrijskim otpadnim vodama bogatim fenolima i cijanidima. [43] Drugo istraživanje bavilo se određivanjem inhibicije rasta neimobiliziranih bakterijskih stanica *Pseudomonas putida* te je pri koncentracijama cijanida ispod 4 mmol/dm³ zabilježen nesmetan rast stanica. Međutim, pri koncentracijama cijanida iznad 6 mmol/dm³ uočena je privremena faza usporenog rasta, a iznad 8 mmol/dm³ uočava se inhibicija rasta bakterije. [50] Također, provedeni su testovi toksičnosti na otpadnim industrijskim vodama

koristeći cijele bakterijske stanice *Pseudomonas putida* kao biosenzore. Bakterija je reagirala na prisutnost toksičnih tvari pokazujući fiziološke ili genetske promjene. Istraživane su polarne, ionske i visoko topljive organske onečišćujuće tvari u otpadnim vodama, pri čemu su najveće vrijednosti inhibicije zabilježene za polietoksilirani nonilfenol, na temelju vrijednosti EC₅₀. Uzorak se smatra toksičnim onda kada je postotak inhibicije veći od 20 %. Ovakav test toksičnosti omogućuje identifikaciju toksičnih tvari prisutnih u ispitivanom uzorku. Korištenje bakterija za provođenje testova toksičnosti ima niz prednosti, uključujući jednostavnost korištenja, kratko razdoblje testiranja, nedostatak etičkih problema i potrebu za manjim količinama uzoraka ili organskih otapala. [6]

2.4. MIKROALGA *Chlorella* sp.

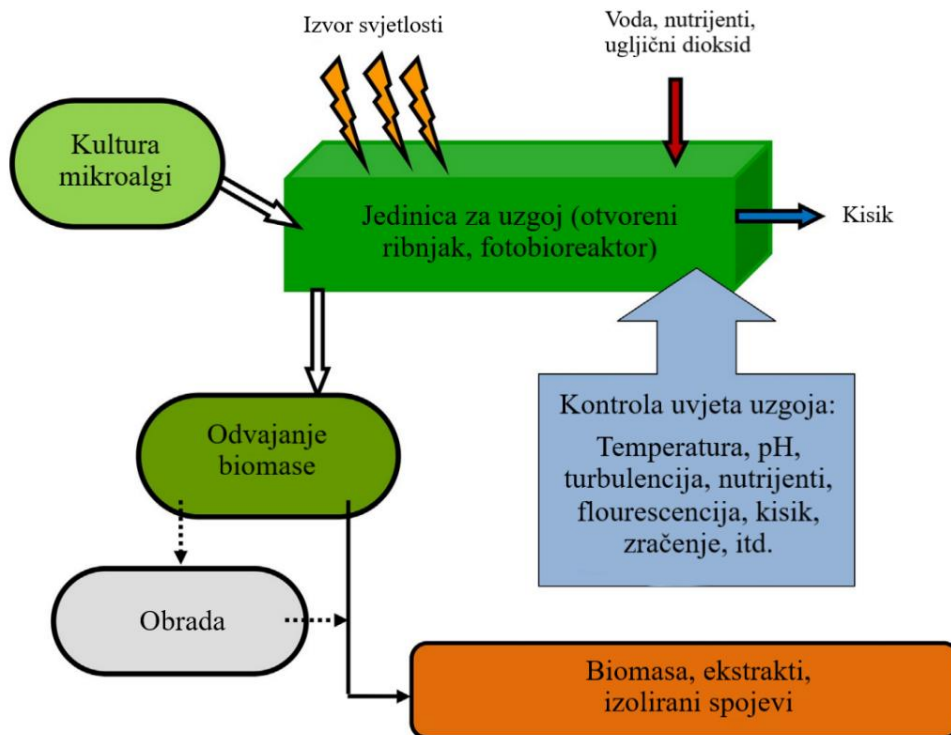
2.4.1. Svojstva mikroalge *Chlorella* sp.

Mikroalga *Chlorella* je rod jednostaničnih zelenih mikroalgi koje pripadaju razredu *Chlorophyta*. Stanice mikroalge *Chlorella* obično su promjera od 2 do 10 µm (slika 13.). [53] Stanična stijenka sastoji se od polisaharida, proteina i lipida, što joj daje elastičnost i otpornost na vanjske utjecaje. [54] Stijenka ima ključnu ulogu u zaštiti staničnog sadržaja, regulaciji osmotskog tlaka te interakcijama s okolišem. Unutar stanice, mikroalga *Chlorella* sp. sadrži brojne organele poput kloroplasta, koji su odgovorni za fotosintezu i proizvodnju hranjivih tvari. Kloroplasti su bogati pigmentom klorofilom i drugim pigmentima, od čega potječe karakteristična zelena boja koja joj omogućuje efikasnu apsorpciju svjetlosne energije. Iz tog su razloga fotosintetski organizmi, koji su sposobni koristiti sunčevu svjetlost za pretvaranje ugljičnog dioksida u organske spojeve. [53]



Slika 13. Mikroskopska slika mikroalge *Chlorella* sp. [55]

Pokazuju iznimnu učinkovitost fotosinteze u usporedbi s kopnenim biljkama i proizvode oko 50 % atmosferskog kisika, rezultat čega su veće stope rasta biomase, ponekad i do deset puta većim od vaskularnih biljaka. [56] Mikroalga *Chlorella* sp. preferira alkalno – okolišne uvjete i može rasti u širokom rasponu pH vrijednosti i temperatura, budući da neki sojevi mogu rasti između 15 i 40 °C. Ova prilagodljivost omogućuje joj opstanak u različitim vodenim okruženjima, uključujući slatkovodne i morske ekosustave. Žive u vodenim, ali i u kopnenim staništima. [53] Također, mikroalga *Chlorella* sp. poznata je po brzom rastu, što je čini izuzetno produktivnom u biotehnološkim procesima. [56] Uz to, ima sposobnost asimilacije i akumulacije različitih hranjivih tvari i elemenata iz okoliša, što je čini korisnim organizmom u bioremedijaciji zagađenih voda i tla. [54] Mikroalge su gotovo neiskorišten resurs, s procijenjenim brojem vrsta između 30000 i 1000000, ali samo njih 15 može se komercijalno uzgajati u velikom opsegu. [57] Uzgajaju se u jedinici za uzgoj u vodenom mineralnom mediju uz prisutno osvjjetljenje te uz opskrbu hranjivim tvarima i ugljičnim dioksidom. Dobar proces berbe i odvodnjavanja može proizvesti mulj mikroalgi sa sadržajem biomase od 20-30 % (slika 14.). Biomasa se odvaja od medija i dodatno obrađuje, nakon čega se može koristiti kao dodatak hrani, hrana za stoku, ili kao izvor bioaktivnih tvari za farmakologiju i kozmetiku. [53]

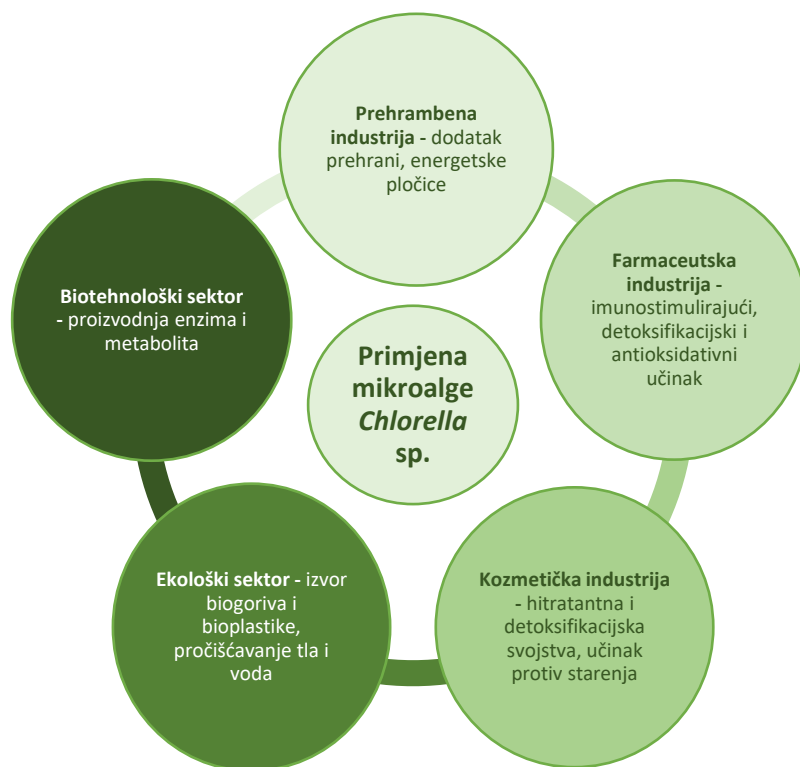


Slika 14. Shematski prikaz uzgoja i prerade mikroalge *Chlorella* sp. [53]

2.4.2. Primjena mikroalge *Chlorella* sp.

Svjetska proizvodnja mikroalgi kreće se oko 50000 t godišnje, pri čemu vrste *Chlorella* sp. i *Spirulina* sp. čine više od 90 % ukupne proizvodnje biomase mikroalgi. [58,59] Primjena mikroalge *Chlorella* sp. obuhvaća širok spektar područja, uključujući prehrambenu industriju, farmaciju, kozmetiku, kao i ekološke i biotehnološke sektore (slika 15.). U prehrambenoj industriji, *Chlorella* sp. se koristi kao dodatak prehrani zbog visokog udjela proteina, vitamina, minerala te omega – 3 i omega – 6 masnih kiselina. [59] Iako s pretežno koristi kao dodatak prehrani, uvodi se i u druge prehrambene proizvode među kojima su kolači, tjestenine, jogurt i slično. [60] U farmaceutskoj industriji, *Chlorella* se istražuje zbog svojih potencijalnih imunostimulativnih i detoksikacijskih svojstava te kao izvor bioaktivnih spojeva. [60,61] Navedeni biološki aktivni spojevi sadrže proteine, lipide, ugljikohidrate, vitamine i razne sekundarne metabolite. Ovi spojevi imaju potencijal doprinijeti razvoju novih lijekova. Raznolika biološka svojstva mikroalge *Chlorella* sp. mogla bi biti korisna za razvijanje inovativnih terapija za različite bolesti, kao što su različite vrste raka, bolesti srca i virusne infekcije. To naglašava važnost daljnjih istraživanja ovih mikroalgi i njihovih biološki aktivnih spojeva, jer predstavljaju obećavajući izvor u budućnosti farmaceutske industrije. [59,61] Kozmetička industrija koristi mikroalgu *Chlorella* sp. zbog njezinih hidratantnih svojstava i

učinaka protiv starenja, koja mogu poboljšati stanje kože i kose. Bioaktivne komponente karakteristične mikroalgi *Chlorella* sp., zbog kojih je pronašla svoju ulogu u kozmetici, su karotenoidi, vitamini C i E, polisaharidi, peptidi, fenoli i flavonidi. [59] U ekološkom sektoru, mikroalga *Chlorella* sp. se istražuje kao potencijalni izvor biogoriva i bioplastika te za pročišćavanje zagađenih voda i tla. Proizvodnja biogoriva proizlazi iz potencijala mikroalge za proizvodnju lipida i ugljikohidrata, koji se mogu prevesti u različita biogoriva, kao što su biodizel i bioplin. Biodizel je moguće dobiti iz lipida procesom transesterifikacije, dok se bioplin može generirati anaerobnom digestijom biomase mikroalgi. Posljednjih godina, mikroalge su korištene za detoksikaciju različitih toksičnih tvari s različitim svojstvima i karakteristikama koje potječu iz poljoprivrednog, industrijskog i domaćeg sektora. [54,59] Sustavi temeljeni na mikroalgama imaju izvanredne sposobnosti bioremedijacije otpadnih voda, pri čemu može doći do smanjenja vrijednosti BPK i KPK do 83 %. [62] Sustavi za pročišćavanje voda temeljeni na mikroalgama posjeduju prirodne sposobnosti dezinfekcije te su učinkovitiji u smanjenju onečišćenja od konvencionalnih metoda pročišćavanja voda. Njihova uloga u uklanjanju organskih i novih onečišćenja te uporabi važnih hranjivih tvari poput fosfora i dušika iz sekundarnih otpadnih voda sve više se prepoznaje kao održiva strategija s industrijskim potencijalom. [57,59] Također, mikroalge su najperspektivniji agensi za dekontaminaciju brojnih onečišćivača zbog visokog omjera površine prema volumenu. [57] Nastala biomasa može se pretvoriti u biovodik i biougljikovodike te mogu poboljšati prinos visokokvalitetne biomase za proizvodnju biogoriva koja se mogu komercijalno koristiti za zrakoplove i druga vozila. [64] Biotehnološki procesi uključuju proizvodnju enzima, metabolita i drugih korisnih spojeva iz mikroalge *Chlorella* sp., kao i genetičko inženjerstvo s ciljem poboljšanja njezinih karakteristika. [63,64] Provedeno je istraživanje mikroalgi uzgajanih u anaerobnom digestoru za proizvodnju biogoriva i pokazalo se da su smanjile 57,4 % problema s eutrofikacijom, 22,6 % ozona i 2,7 % globalnog zatopljenja. Novijim procesima omogućena je proizvodnja do 70 t biomase i 15000 L ulja po hektaru zemljišta korištenjem mikroalgi *Chlorella* sp. [57]



Slika 15. Primjene mikroalge *Chlorella* sp. u različitim industrijama. [57,59]

2.4.3. Ekotoksičnost cijanida na mikroalgu *Chlorella* sp.

Alge, autotrofni organizmi, pretvaraju anorganske izvore ugljika poput karbonata i CO₂ u biomasu, oslobađajući pri tome kisik u okoliš. Nedavna istraživanja ističu primjenu mikroalgi *Chlorella* sp. u biotehnologiji za obradu otpadnih voda. Otkriveno je da mikroalge, poput ostalih algi i cijanobakterija, poboljšavaju aeraciju, što povoljno utječe na učinkovitost u razgradnji organskih onečišćujućih tvari. Njihova sposobnost korištenja onečišćenja u otpadnim vodama kao izvora hranjivih tvari smanjuje potrebu za dodatnim unosom hranjiva. Brz rast i prilagodljivost mikroalgi različitim uvjetima čine ih poželjnima za primjenu u bioremedijaciji. [53,63] Proizvodi s dodanom vrijednošću poput etanola, metana i ostalih proizvoda koji se koriste kao hrana za stoku ili organsko gnojivo, dobiveni iz mikroalgi, čine ih nezamjenjivima u suvremenom svijetu. Mikroalge mogu uklanjati opasne tvari, a mnoge od njih mogu prelaziti između fotoautotrofnog, miksofototrofnog i heterotrofnog rasta. [53] Odlični su pokazatelji kvalitete vode, odnosno zelena alga primjer je pokazatelja onečišćene vode. Primijećeno je da zelene mikroalge apsorbiraju i akumuliraju cijanide putem različitih mehanizama prilikom obrade otpadnih voda, iako trenutno ne postoji izvještaj o točnim metabolizmima cijanida u prisutnosti mikroalgi. Pretpostavlja se da fotosintetski procesi unutar stanica mikroalgi doprinose detoksikaciji cijanida pretvarajući ga u organske dušične spojeve i uključujući ga u staničnu biomasu. [53,62,63] Mikroalga *Clorella* sp. također je korištena i u ekotoksikološkim

testovima, gdje je ispitan štetni učinak KCN-a na mikroalgu. CFU vrijednost smanjila se u većini slučajeva, pri čemu su najveće inhibicije iznosile 48 %, čak i do 99 % pri koncentraciji od 100 mg/L KCN-a. Navedena koncentracija ozbiljno je oštetila membranu stanica mikroalge. [65]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

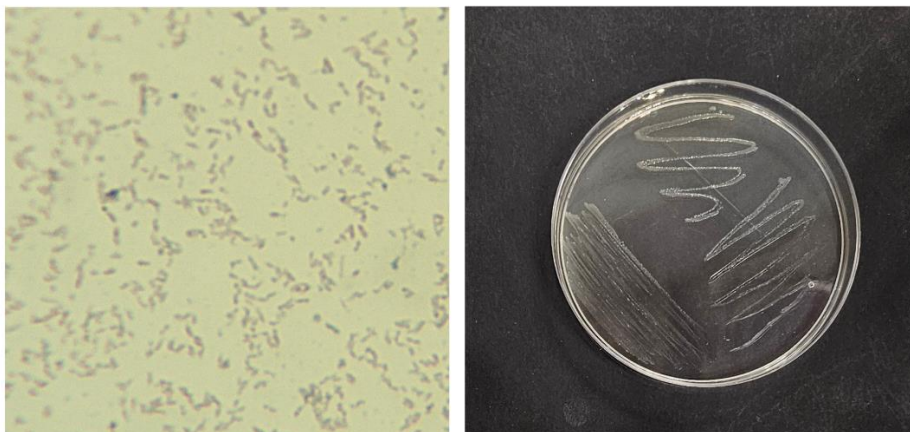
3.1. Materijali

3.1.1. Cijanidi

Ispitivana tvar korištena za određivanje ekotoksičnosti su cijanidi, koji su bili ispitivani u sljedećim koncentracijama: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L te 1 mg/L.

3.1.2. Mikroorganizmi

Ispitivanja ekotoksičnosti provedena su korištenjem testnih organizama – bakterijske kulture *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* prethodno je uzgojena, a slikom 16. prikazano je njezino izrastanje na površini hranjivog agara dobiveno tehnikom iscrpljivanja na 37 °C tijekom 24 h te mikrofotografija trajnog preparata obojanog po Gramu, mikroskopiranog pri povećanju od 1000x.



Slika 16. Mikrofotografija bakterijske kulture *Pseudomonas putida* obojana po Gramu i mikroskopirana optičkim mikroskopom, P = 1000x (slika lijevo) te izrasla bakterijska kultura *Pseudomonas putida* na hranjivom agaru nakon 24 h na 37 °C u Petrijevoj zdjelici dobivena tehnikom iscrpljivanja (slika desno).

Kultura mikroalge *Chlorella* sp. također je prethodno uzgojena te je na slici 17. prikazana mikrofotografija razrijeđene uzgojene kulture uz ukupno povećanje mikroskopa od 400x.



Slika 17. Mikrofotografija mikroalge *Chlorella* sp. snimljena optičkim mikroskopom pod povećanjem P = 400x.

3.2. Mediji i kemikalije

3.2.1. Mineralni medij

Mineralni medij korišten je za preduzgoj i pripremu suspenzije bakterije *Pseudomonas putida*. Sastav mineralnog medija i potrebne mase za volumen od 1 L prikazani su tablicom 3.

Tablica 3. Sastav mineralnog medija za provedbu testova toksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* za 1 L otopine.

Tvar	Masa / mg
NaNO₃	500
K₂HPO₄	120
KH₂PO₄	60
MgSO₄ · 7H₂O	200
Željezov (III) citrat	0,50

Mineralni medij pripremljen je u odmjernoj tikvici, nakon čega je pH vrijednost regulirana s 1 M NaOH i 1 M HCl i postavljena na vrijednost od 6,911. Prije upotrebe, svježe pripremljeni mineralni medij je steriliziran vlažnom sterilizacijom u autoklavu pri temperaturi 121 °C i tlaku 1 atm tijekom 15 minuta.

3.2.2. Fiziološka otopina

Fiziološka otopina korištena je za pripremu decimalnih razrjeđenja, odnosno u svrhu određivanja ukupnog broja živih stanica bakterija (*Colony forming units*, CFU). Fiziološka otopina predstavlja 0,9 % -tnu otopinu NaCl-a, koja je prije upotrebe sterilizirana u autoklavu.

3.2.3. Hranjivi agar

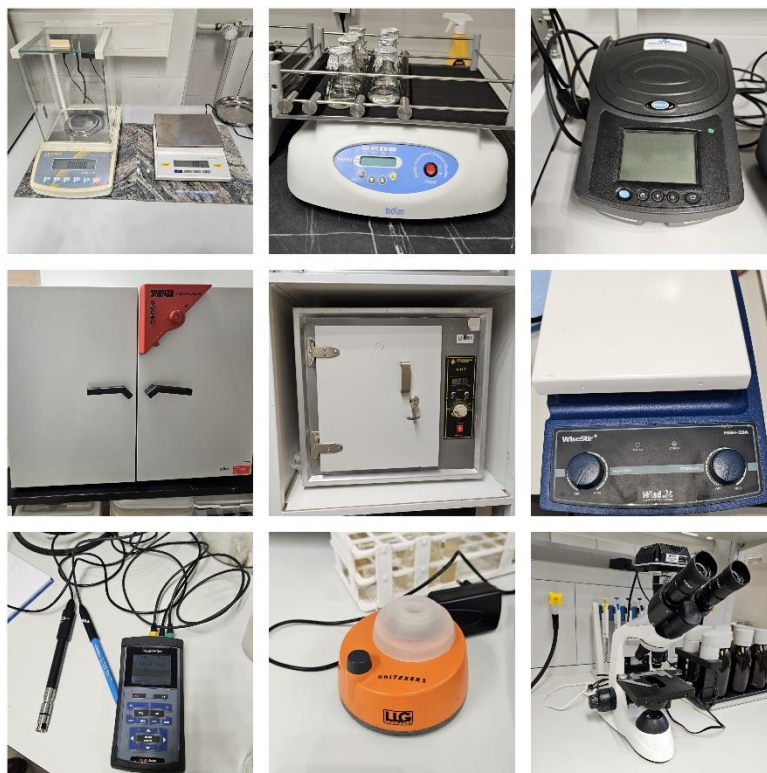
Hranjivi se agar koristio kao podloga za uzgoj bakterije *Pseudomonas putida*. Pripremljen je vaganjem hranjivog bujona prema uputi proizvođača uz dodatak 1,8 % hranjivog agara (Agar Technical). Nakon vaganja navedenih komponenti, otopljene su u deioniziranoj vodi te je otopina ostavljena 15 minuta da bubri. Nakon toga je otopina zagrijavanja do vrenja te je prije upotrebe sterilizirana u autoklavu.

3.2.4. Bazalni medij

Bazalni medij korišten je za uzgoj mikroalge *Chlorella* sp. Pripremao se tako da se 10 mL prethodno pripremljene otopine bazalnog medija otpipetira u odmjernu tikvicu od 500 mL koja je potom, nadopunjena deioniziranom vodom. Podešena je pH-vrijednost na 8,151 pomoću 1 M NaOH i 1 M HCl. Tako pripremljeni bazalni medij steriliziran je vlažnom sterilizacijom.

3.3. Mjerni instrumenti i oprema

Vaganje je provedeno korištenjem vaga KERN ALJ 220-4NM i Sartorius GM6101. Suspenzije su miješane rotacijskom tresilicom BIOSAN PSU-20im Multi-functional Orbital Shaker. Za sterilizaciju otopina mineralnog medija, bazalnog medija, fiziološke otopine i hranjive podloge te čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa i nastavaka, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Optička gustoća određivana je na spektrofotometru (DR/2400 Hach, SAD) pri valnoj duljini $\lambda = 600$ nm. Za uzgoj bakterije korišten je termostat BINDER i EBT – Termomedicinski aparat pri 37 °C. Prilikom podešavanja pH vrijednosti mineralnog i bazalnog medija te suspenzija korištena je magnetska miješalica WiseStir MSH-20A. Za određivanje pH-vrijednosti korištena je pH elektroda WTW SenTix 940 te WTW Fdo 925 za određivanje sadržaja kisika, pomoću uređaja WTW Multi 3430 Multiparameter Meter. Homogeniziranje decimalnih razrjeđenja provedeno je pomoću homogenizatora LLG-LABWARE, LLG-uniTEXER. Za dobivanje mikroskopskih slika korišten je optički mikroskop KERN Optics OBE 134. Uređaji su prikazani slikom 18.



Slika 18. Mjerni instrumenti i oprema korišteni u radu.

3.4. Metoda rada

3.4.1. Priprema otopine cijanida

Pripremljena je temeljna otopina cijanida koncentracije 150 mg/L te je podešena pH-vrijednost od 7,079. Od temeljne otopine cijanida pripremljeno je 6 radnih koncentracija cijanida od 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L, prema odgovarajućem radnom volumenu za svaki pokus.

3.4.2. Uzgajanje bakterijske kulture *Pseudomonas putida*

Bakterijska kultura uzgajana je 24 sata na hranjivom agaru pri 37 °C. Preduzgoj suspenzije tako pripremljene kulture proveden je u mineralnom mediju pH-vrijednosti od 6,911 u trajanju od $5 \pm 0,5$ sati na rotacijskoj tresilici uz brzinu okretaja od 150 o/min pri sobnoj temperaturi. Provođenje preduzgoja nužno je za prilagodbu bakterijske kulture na uvjete mineralnog medija, kako bi provedeni eksperiment bio uspješan.

3.4.3. Uzgajanje kulture mikroalge *Chlorella* sp.

Kultura mikroalgi *Chlorella* sp. uzgajana je 10 dana u bazalnom mediju pH–vrijednosti 8,151. Uzgoj je proveden aeracijom kulture pomoću aeracijske pumpe, koja upuhuje zrak prolaskom kroz sterilni okrugli filter, čije su pore promjera 0,45 µm s ciljem osiguravanja sterilnih uvjeta. Također, provedena je i izmjena svjetlosti, odnosno 16 h kultura je bila izložena svjetlosti, a 8 h je bila u mraku. Dobivena je gusta suspenzija, koja se po potrebi razrjeđivala.

3.5. Provedba testova ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Test ekotoksičnosti cijanida pomoću bakterija *Pseudomonas putida* proveden je prema ISO uputama (ISO 10712: 1995, Water quality—*Pseudomonas putida* growth inhibition test pseudomonas cell multiplication inhibition test) uz manje modifikacije. [66] Promjena od standardizirane metode je napravljena u vremenu izlaganja bakterijske kulture ispitivanoj tvari. Naime, izlaganje je praćeno tijekom 72 h umjesto 16 h koliko je prema metodi. Tijekom provedbe pokusa, svakih 24 h određivana je CFU vrijednost pripremom decimalnih razrjeđenja. CFU vrijednost definira ukupan broj živih stanica bakterije, odnosno ukupan broj prisutnih kolonija. Svakom uzorku pripremljena su razrjeđenja od 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} nakon 24 h miješanja. Razrjeđenje od 10^{-2} je pripremljeno dodatkom 100 µL dobro homogenizirane otopine u epruvetu s 9,9 mL sterilne fiziološke otopine. Sljedeće razrjeđenje, od 10^{-4} , pripremljeno je dodatkom 100 µL prethodnog razrjeđenja u 9,9 mL fiziološke otopine. Iz navedenog razrjeđenja izuzima se 1 mL i dodaje 9 mL fiziološke otopine za dobivanje razrjeđenja od 10^{-5} te se 1 mL takvog razrjeđenja dodaje u epruvetu s 9 mL fiziološke otopine za postizanje razrjeđenja od 10^{-6} . Sve je provedeno sterilnom tehnikom rada. Razrjeđenjima 10^{-5} i 10^{-6} za svaku koncentraciju izuzet je 1 mL i otpipetiran u Petrijevu zdjelicu te zaliven s hranjivim agarom. Sve su Petrijeve zdjelice homogenizirane i postavljene u termostat na inkubaciju pri 37 °C u trajanju od 24 h. Isti je postupak ponovljen nakon 48 h i 72 h. Kolonije koje su izraste nakon inkubacije prebrojane su i na temelju dobivene vrijednosti, preko jednadžbe (1), određena je vrijednost CFU:

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost upotrijebljenog razrjeđenja}$$

[stanica/mL] (1)

Iz poznatih vrijednosti CFU, inhibicija rasta bakterijskih stanica određena je prema jednadžbi (2):

$$INH = \frac{CFU_{kontrola} - CFU_{uzorak}}{CFU_{kontrola}} \times 100 [\%]$$
 (2)

Pri tome INH predstavlja postotak inhibicije, $CFU_{kontrola}$ vrijednost ukupnog broja živih bakterijskih stanica za kontrolni uzorak, bez cijanida, a CFU_{uzorak} vrijednost ukupnog broja živih bakterijskih stanica za ispitivani uzorak.

Vrijednosti EC_{20} i EC_{50} pokazatelji su koji se često koriste u ekotoksikološkim testovima, a odnose se na graničnu koncentraciju toksične tvari pri kojoj tvar ima štetan učinak na ispitivane organizme. EC_{20} predstavlja koncentraciju pri kojoj tvar ima štetan utjecaj na 20 % ispitivanih organizama, a EC_{50} koncentraciju na kojoj tvar ima određen štetan utjecaj na 50 % ispitivanih organizama. Ove vrijednosti određene su linearizacijom eksperimentalnih podataka (postotaka inhibicije). Računa se gama faktor, prema prikazanoj jednadžbi (3), koji se prikazuje u ovisnosti o logaritamskoj vrijednosti ispitivanih masenih koncentracija cijanida.

$$\gamma = \frac{INH}{100 - INH} \quad (3)$$

Početni uvjeti rada s pripremljenim uzorcima prikazani su tablicom 4.

Tablica 4. Početni uvjeti za eksperiment ispitivanja ekotoksičnosti cijanida primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

pH ₀ / -	T ₀ / °C	γ(O ₂) / mg/L	CFU ₀ /st/mL	log CFU ₀ / -	OG ₀ / -
6,882	22,4	8,47	2,8×10 ⁸	8,453	0,19

3.6. Provedba testova ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Ekotoksičnost cijanida određena je i pokusom s mikroalgom *Chlorella* sp. prema OECD uputama, gdje je također određivana CFU vrijednost te postotak inhibicije rasta mikroalgi. [67,68] CFU vrijednost određivana je pomoću Thomine komorice. Sterilnom Pasteur pipetom izuzima se 2 kapi homogeniziranog uzorka iz Erlenmeyerovih tikvica i postavlja na Thominu komoricu te pokriva pokrovnicom. Korištenjem optičkog mikroskopa na ukupnom povećanju od 400x, brojan je ukupni broj stanica. Ukupan broj živih stanica mikroalgi, N , određena je sljedećom jednadžbom (4):

$$N = \frac{m \times n \times 16 \times 10^4}{K} [\text{stanica/mL}] \quad (4)$$

pri čemu je m ukupan broj prebrojanih stanica, n razrjeđenje, 16 predstavlja ukupan broj velikih kvadrata predmetnice, a K broj velikih kvadrata u kojima je provedeno brojanje stanica mikroalgi. Inhibicija rasta određena je na prethodno opisani način, odnosno jednadžbom (2). Postupak je proveden za 24 h, 48 h i 72 h nakon početka pokusa, uz stalno miješanje na

rotacijskoj tresilici. EC₂₀ i EC₅₀ određeni su jednadžbom (3), kao i za bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida*. Početni uvjeti eksperimenta s *Chlorellom* sp. prikazani su tablicom 5.

Tablica 5. Početni uvjeti za eksperiment ispitivanja ekotoksičnosti cijanida primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

pH₀ / -	T₀ / °C	CFU₀ /st/mL	log CFU₀ / -	OG₀ / -
7,748	23,0	5,87×10 ⁵	5,768	0,02

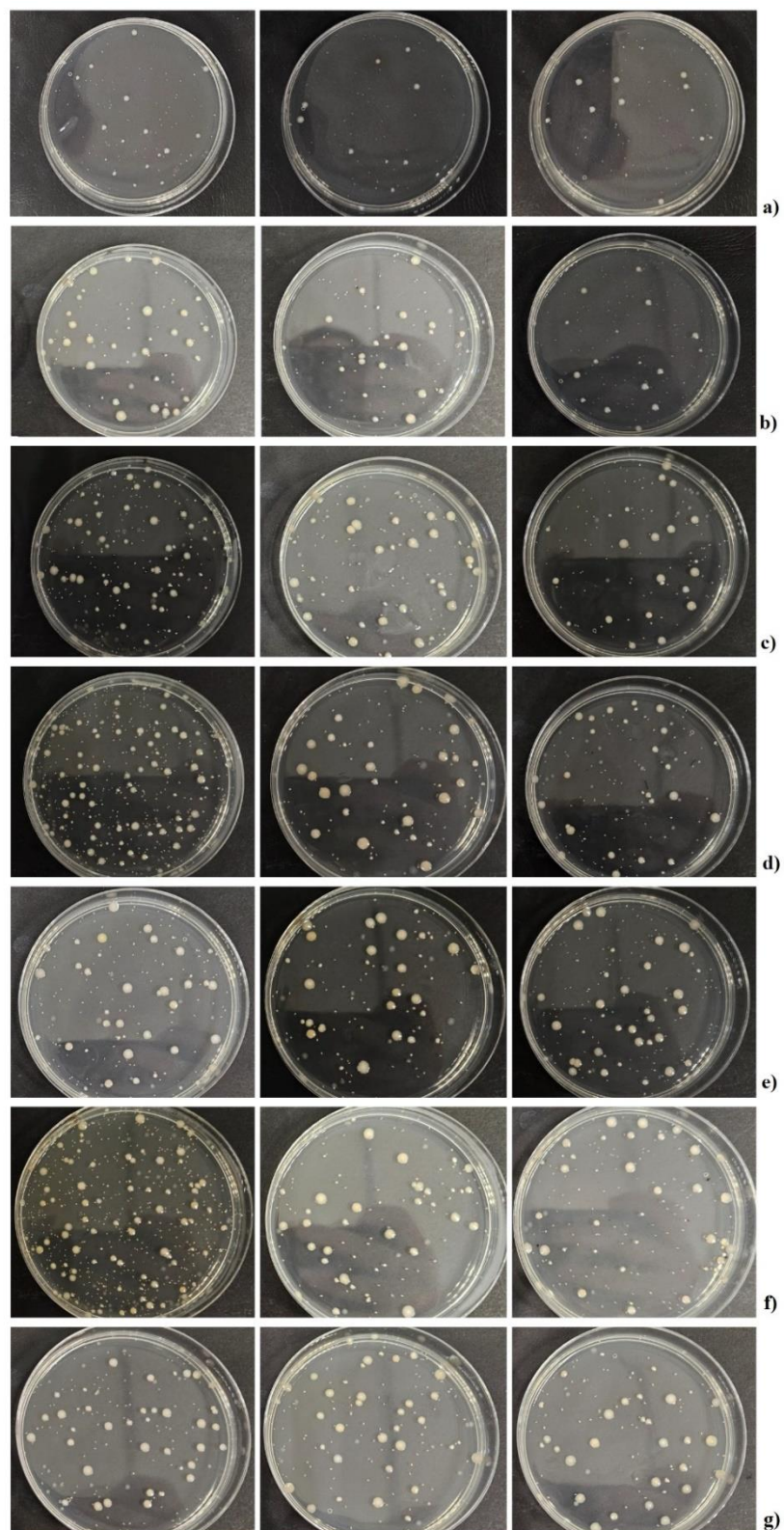
4. REZULTATI I RASPRAVA

Ispitivanje ekotoksičnosti cijanida provedeno je na bakterijskoj kulturi *Pseudomonas putida* i mikroalgi *Chlorella* sp. u trajanju od 72 h i to u uvjetima različitih koncentracija cijanida usporedbom s kontrolnim uzorkom, odnosno uzorkom bez prisutnih cijanida. Određene su CFU vrijednosti i izračunat postotak inhibicije rasta navedenih testnih organizama te su procijenjene EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti. CFU vrijednost se određivala tijekom 24 h, 48 h i 72 h izlaganja. Rezultati su prikazani u nastavku.

4.1. Rezultati testa ekotoksičnosti s bakterijom *Pseudomonas putida*

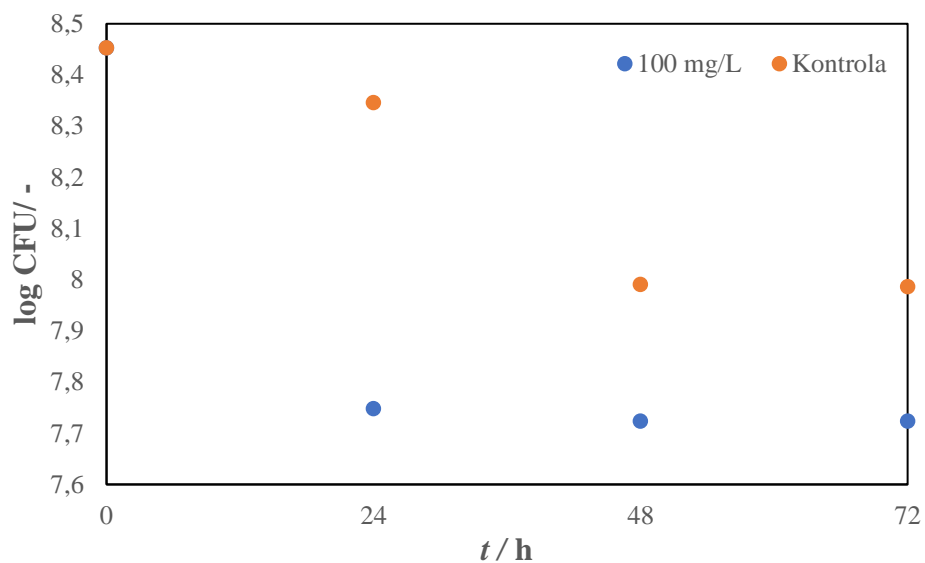
4.1.1. Promjena CFU vrijednosti

CFU vrijednosti određivane su tijekom vremena izuzimanjem uzoraka različitih koncentracija cijanida: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L pri razrjeđenjima od 10⁻⁶. CFU vrijednosti izračunate su korištenjem jednadžbe (1), brojanjem izraslih kolonija na hranjivom agaru u Petrijevoj zdjelici prema postupku opisanom u poglavlju 3.5. Slikom 19. prikazane su Petrijeve zdjelice svih uzoraka nakon inkubacije u termostatu, uključujući i kontrolni uzorak, nakon 24 h (slike lijevo), 48 h (slike u sredini) i 72 h (slike desno) od postavljanja eksperimenta. Proučavanjem slika može se uočiti kako se broj kolonija smanjuje s vremenom u većini slučajeva. Koncentracija cijanida utječe na brojnost izraslih kolonija u Petrijevim zdjelicama te se povećanjem koncentracije cijanida u uzorcima broj izraslih kolonija smanjuje, uz određena odstupanja od tog pravila. Broj kolonija ovisi i o kvaliteti homogeniziranja uzorka prilikom pripreme decimalnih razrjeđenja, što može biti uzrok ponekih neočekivanih brojeva kolonija bakterija. Kontrolni uzorak, u kojem nema prisutnosti cijanida, ima približno isti broj izraslih kolonija u svim vremenima, odnosno nakon 24 h, 48 h i 72 h od trenutka postavljanja eksperimenta. Važno je napomenuti da se pri brojanju računaju samo kružno oblikovane kolonije.

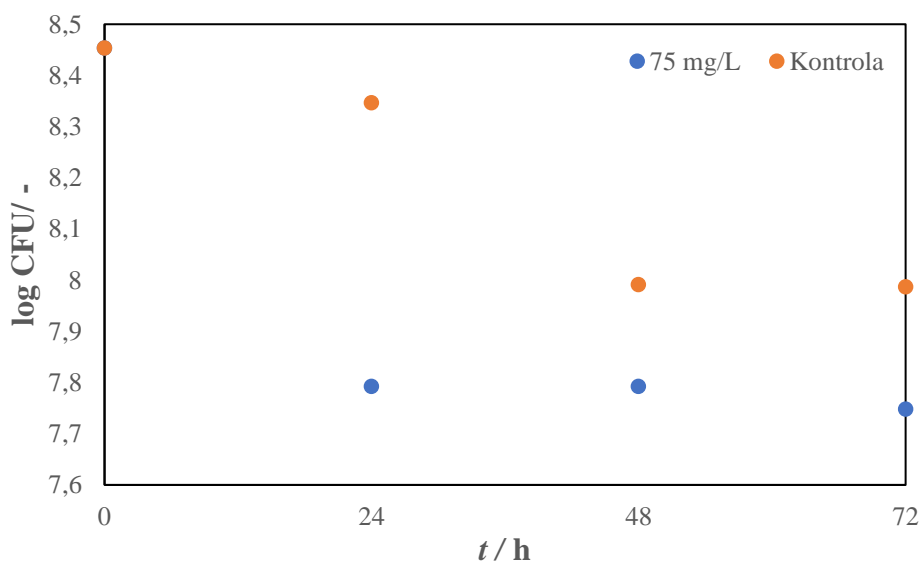


Slika 19. Prikaz izraslih kolonija bakterije *Pseudomonas putida* nakon redom s lijeva na desno 24 h, 48 h i 72 h izlaganja sljedećim koncentracijama cijanida: a) 100 mg/L; b) 75 mg/L; c) 50 mg/L; d) 25 mg/L; e) 10 mg/L; f) 1 mg/L; g) kontrolna proba.

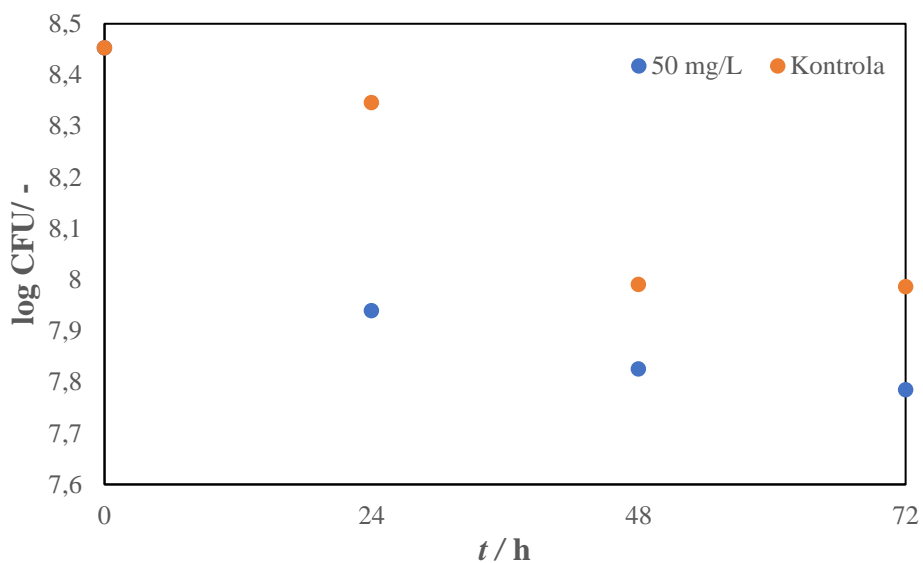
Vrijednosti svih uzoraka uspoređene su s CFU vrijednostima dobivenim za kontrolni uzorak nakon istog vremenskog perioda. Rezultati su prikazani grafički slikama 20. – 25., preko ovisnosti log CFU o vremenu. Mjerenja su obavljena prilikom postavljanja eksperimenta, naznačeno kao 0 h, te u vremenskim intervalima od 24 h, 48 h i 72 h nakon postavljanja eksperimenta. Narančaste oznake predstavljaju kontrolni uzorak, a plave oznake ispitivani uzorak s cijanidima. Slika 20. prikazuje ovisnost log CFU o vremenu za uzorak koji sadrži koncentraciju cijanida 100 mg/L. Moguće je uočiti nagli pad već nakon 24 h, nakon čega slijedi vrlo lagani pad vrijednosti i stagniranje CFU vrijednosti na $5,6 \times 10^7$ stanica/mL. S druge strane, kontrolni uzorak karakteriziran je nešto blažim padom, uz lagano ustaljenje s vremenom i znatno višim CFU vrijednostima ($9,8 \times 10^7$ stanica/mL). Isti trend vidljiv je i kod koncentracije cijanida od 75 mg/L na slici 21., a već kod koncentracije cijanida od 50 mg/L pad postaje nešto blaži. Takav trend prisutan je i pri koncentracijama 25 mg/L te 10 mg/L. Smanjenjem koncentracije cijanida uočeno je vremenski blaži pad CFU vrijednosti. Jedino odstupanje od pada uočeno je kod uzorka s koncentracijom cijanida 1 mg/L. Iako vrijednost ispitivanog uzorka gotovo prati vrijednosti kontrolnog uzorka, uočeno je blagi rast nakon 72 h. Uzrok tomu može biti taj da se bakterija *Pseudomonas putida* s vremenom pri niskim koncentracijama cijanida uspjela prilagoditi na pripremljene uvjete. Moguće je da su se nakon 48. h bakterije počele prilagođavati izloženosti cijanida, što je rezultiralo povećanim rastom bakterijske kulture nakon 72. h. Istraživanja su pokazala da je rast bakterija prvobitno usporen zbog prisutnosti cijanida, ali potom slijedi prilagođavanje na uvjete. [48,56] Utjecaj koncentracije cijanida na brojnost živih bakterijskih stanica lako je uočljiv te povećanje koncentracije cijanida u uzorcima ima velik utjecaj na ukupan broj živih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas putida*. Broj živih stanica smanjuje se s vremenom i s povećanjem koncentracije. Najveće smanjenje CFU vrijednosti uočeno je kod koncentracija 100 mg/L i 75 mg/L.



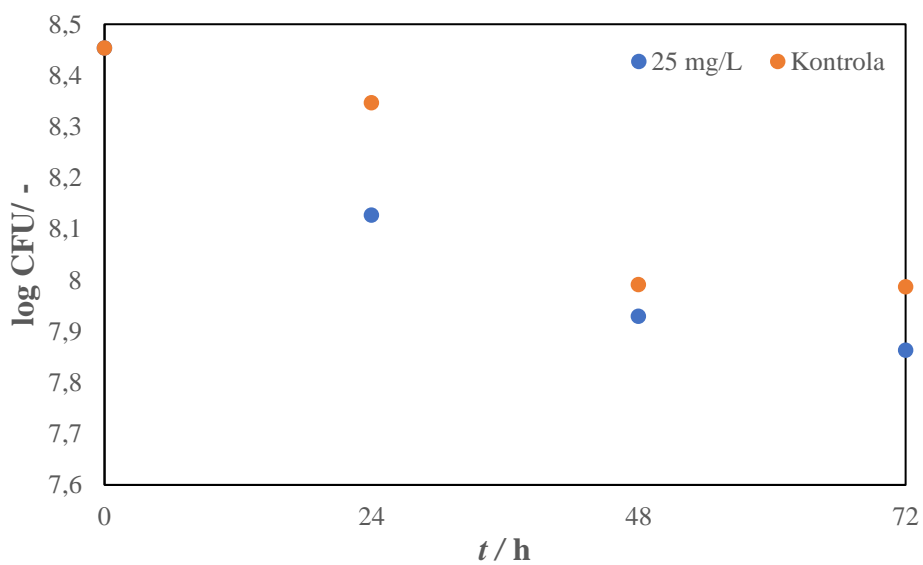
Slika 20. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida od 100 mg/L.



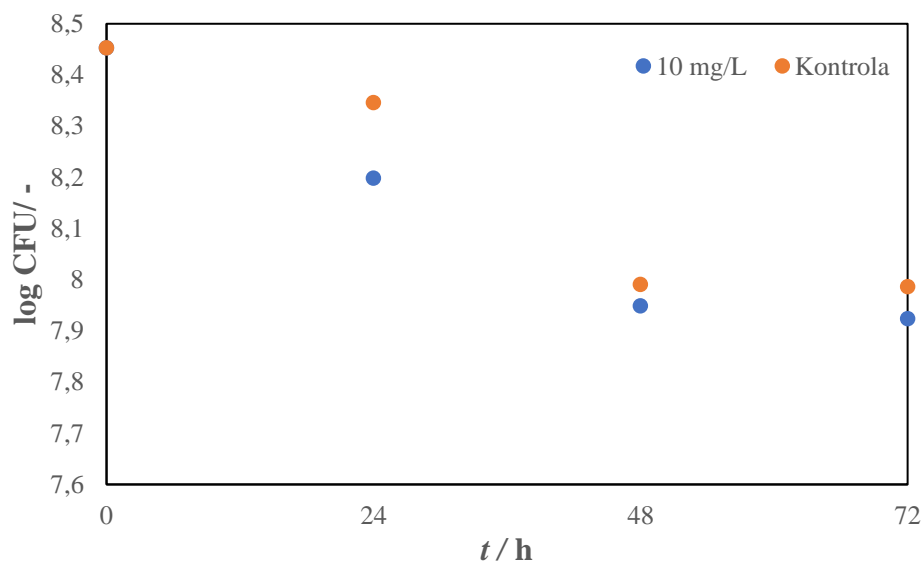
Slika 21. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida od 75 mg/L.



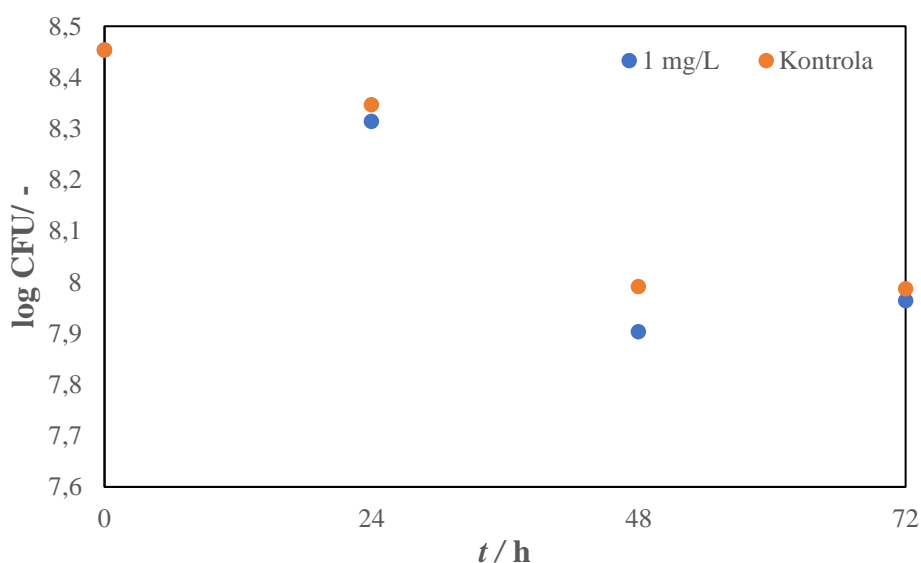
Slika 22. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida od 50 mg/L.



Slika 23. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida od 25 mg/L.



Slika 24. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida od 10 mg/L.

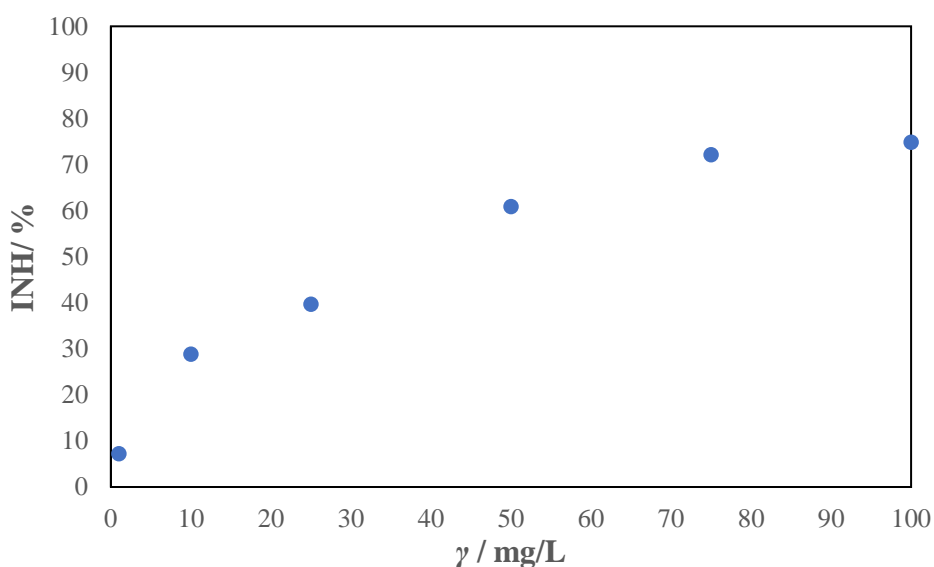


Slika 25. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida od 1 mg/L.

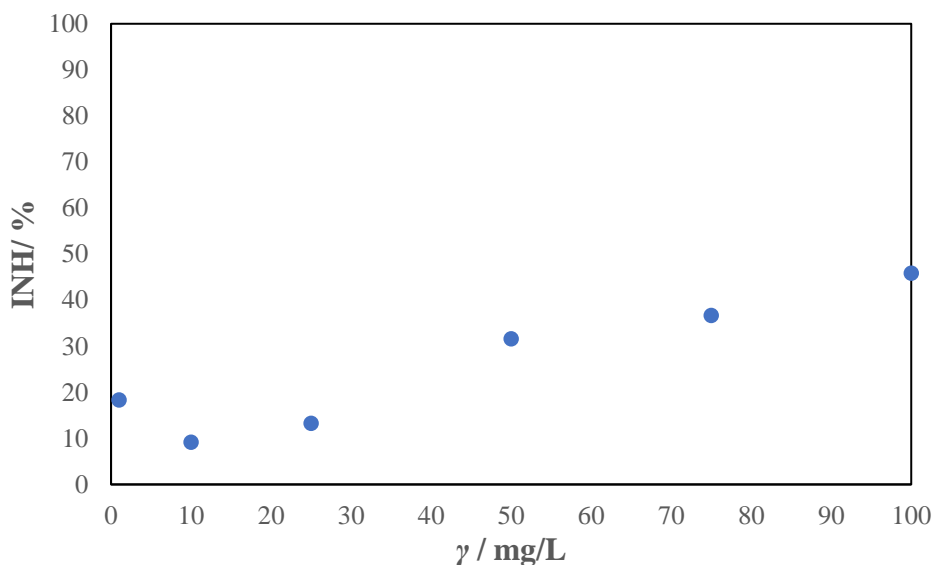
4.1.2. Inhibicija rasta bakterije *Pseudomonas putida*

Postotak inhibicije rasta bakterija *Pseudomonas putida* izračunat je jednadžbom (2) s ciljem određivanja utjecaja cijanida na rast bakterijske kulture. Što je postotak veći, veći je i utjecaj cijanida na bakterijski rast. Inhibicija je izračunata za sve pripremljene uzorke koncentracija cijanida nakon 24 h, 48 h i 72 h. Grafički su inhibicije predočene putem ovisnosti postotka inhibicije o masenoj koncentraciji cijanida u uzorcima. Slika 26. prikazuje inhibiciju

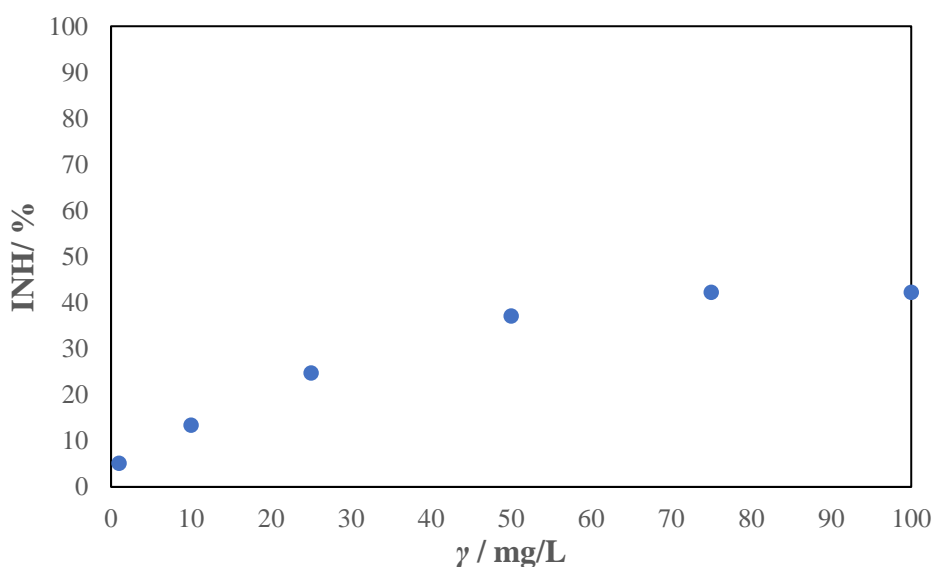
rasta nakon 24 h te je uočen konstantan, ali paraboličan rast. Najveća inhibicija rasta bakterijske kulture iznosi 75 % i to pri koncentraciji cijanida od 100 mg/L. Ispitivane koncentracije nisu dovoljno velike za utvrđivanje granice maksimalne inhibicije rasta bakterija, odnosno vrijednosti inhibicije nakon koje cijanidi više nemaju utjecaj na rast bakterijske kulture. Inhibicija rasta nakon 48 h pokazuje malo odstupanje od očekivanih rezultata za koncentraciju 1 mg/L, zbog prevelike vrijednosti inhibicije, koja se potom smanjuje prije konačnog rasta (slika 27.). Koncentracija cijanida od 1 mg/L vrlo je niska pa je moguće da pri toj koncentraciji cijanidi nemaju toksični učinak na bakteriju, međutim došlo je do efekta hormeze. Hormeza je pojam koji označava odgovor ispitivanog organizma na dozu toksične ispitivane tvari, pri čemu niske doze imaju pozitivan učinak, bez inhibicije. [69] Maksimalan iznos inhibicije nakon 48 h također je pri koncentraciji 100 mg/L i iznosi 46 %. Postotak inhibicije smanjio se u usporedbi s inhibicijom rasta nakon 24 h. Navedeno ukazuje na mogućnost prilagodbe bakterije *Pseudomonas putida* na okruženje i stres cijanida, što je prethodno pretpostavljeno i s analizom CFU vrijednosti. Isti trend vidljiv je i nakon 72 h, prikazan slikom 28. Bakterijska kultura s vremenom se prilagođava eksperimentalnim uvjetima i sve je manja inhibicija rasta, ali više koncentracije čak i nakon 72 h imaju visok postotak inhibicije rasta. Međutim, u ovom slučaju došlo je do stagniranja inhibicije od koncentracije cijanida 75 mg/L, što ukazuje na moguće dosezanje maksimalne koncentracije cijanida koja nakon 72 h ima inhibicijski učinak na rast bakterijske kulture *Pseudomonas putida*. Odnosno, više koncentracije cijanida nakon 72 h ne predstavljaju prijetnju inhibicije rasta bakterijskoj kulturi *Pseudomonas putida*.



Slika 26. Doza odgovor krivulja dobivena nakon 24 h izlaganja bakterije *Pseudomonas putida* ispitivanim koncentracijama cijanida.



Slika 27. Doza odgovor krivulja dobivena nakon 48 h izlaganja bakterije *Pseudomonas putida* ispitivanim koncentracijama cijanida.



Slika 28. Doza odgovor krivulja dobivena nakon 72 h izlaganja bakterije *Pseudomonas putida* ispitivanim koncentracijama cijanida.

4.1.3. Procjena EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti

EC₂₀ i EC₅₀ parametri su koji se često koriste pri određivanju ekotoksičnosti tvari za određene organizme. U konkretnom slučaju s bakterijskom kulturom *Pseudomonas putida*, EC₂₀ označava koncentraciju tvari koja uzrokuje određeni štetni učinak na 20 % bakterijske kulture, dok EC₅₀ predstavlja koncentraciju tvari koja izaziva štetni učinak na 50 % bakterijske kulture *Pseudomonas putida*. Vrijednosti su određene linearizacijom eksperimentalnih

podataka, odnosno postotaka inhibicije ovisno o logaritamskoj vrijednosti ispitivanih masenih koncentracija cijanida. Korištenjem jednadžbe pravca, procijenjene su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, koje su prikazane u tablici 6. Tablicom su prikazane dobivene vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ procijenjene kao učinak cijanida na bakteriju *Pseudomonas putida*. Koncentracija EC₅₀ ukazuje da cijanidi imaju štetni učinak na 50 % bakterijske kulture pri 29,57 mg/L. Štetni učinak cijanida na 20 % bakterijske kulture *Pseudomonas putida* iznosi 5,04 mg/L. Rezultati su u skladu s prethodno navedenim tvrdnjama iznesenim na temelju određivanja inhibicije i CFU vrijednosti.

Tablica 6. Procijenjene EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti dobivene nakon izlaganja bakterije *Pseudomonas putida* ispitivanim koncentracijama cijanida.

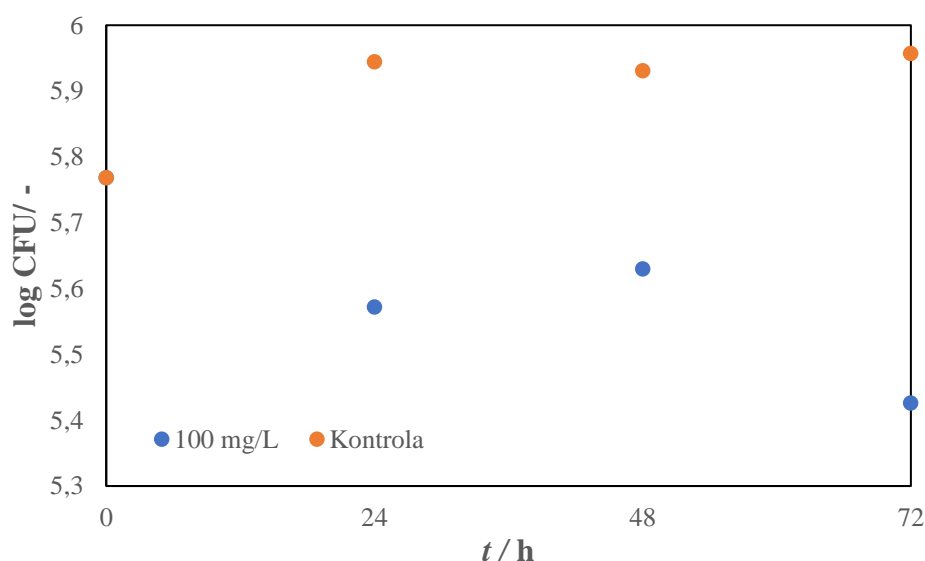
γ / mg/L	
EC ₂₀	5,04
EC ₅₀	29,57

4.2. Rezultati testa ekotoksičnosti s mikroalgom *Chlorella* sp.

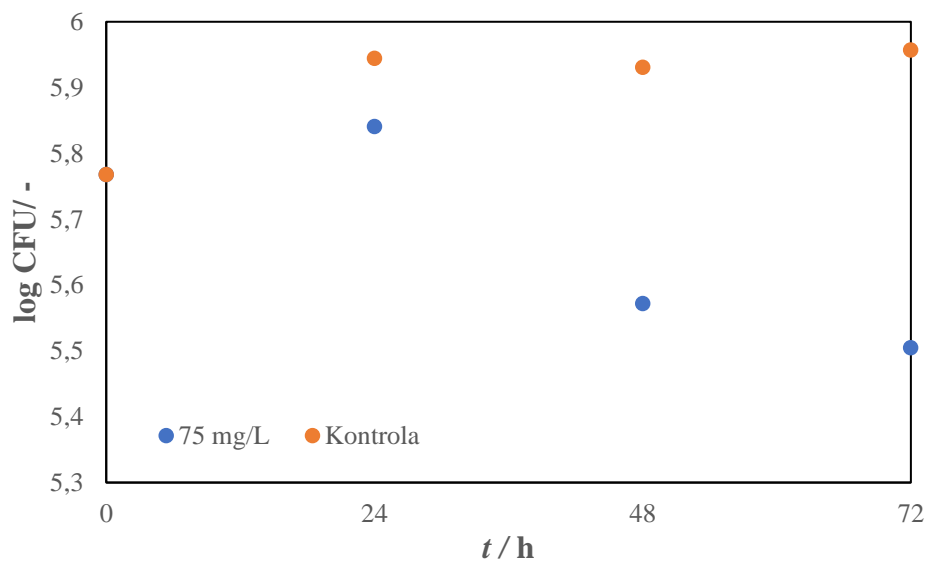
4.2.1. Promjena CFU vrijednosti

Promjena CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. određena je za uzorke koncentracije cijanida od 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L, postupkom opisanom u poglavlju 3.6. Određene su početne vrijednosti, koje su na grafu predstavljene vremenom 0 h te 24 h, 48 h i 72 h nakon postavljanja eksperimenta za sve koncentracije i kontrolni uzorak kako bi se provela usporedba vrijednosti. Rezultati su prikazani grafički, slikama 29. – 34., na kojima su prikazane ovisnosti logCFU o vremenu. Narančaste su oznake kontrolnog uzorka, a plave oznake ispitivani uzorak s cijanidima. Slika 29. prikazuje ovisnost logCFU o vremenu za uzorak koji sadrži koncentraciju cijanida 100 mg/L. Vrijednosti logCFU znatno su niže od vrijednosti zabilježenih za kontrolni uzorak, ali je uočen i blagi porast nakon 48 h, što se može pripisati prilagođavanju mikroalge *Chlorella* sp. na prisutnost cijanida, iako potom slijedi veliki pad vrijednosti. Mogući uzrok rasta vrijednosti je i nejednolika homogeniziranost uzorka prilikom određivanja CFU vrijednosti. Isti trend promjene uočen je i za ostale ispitivane koncentracije cijanida, kod kojih je prisutan pad vrijednosti logCFU s vremenom. Smanjenjem koncentracije cijanida u uzorcima, smanjuje se i promjena vrijednosti logCFU s vremenom, ali i u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Pri niskim ispitivanim koncentracijama od 10 mg/L i 1

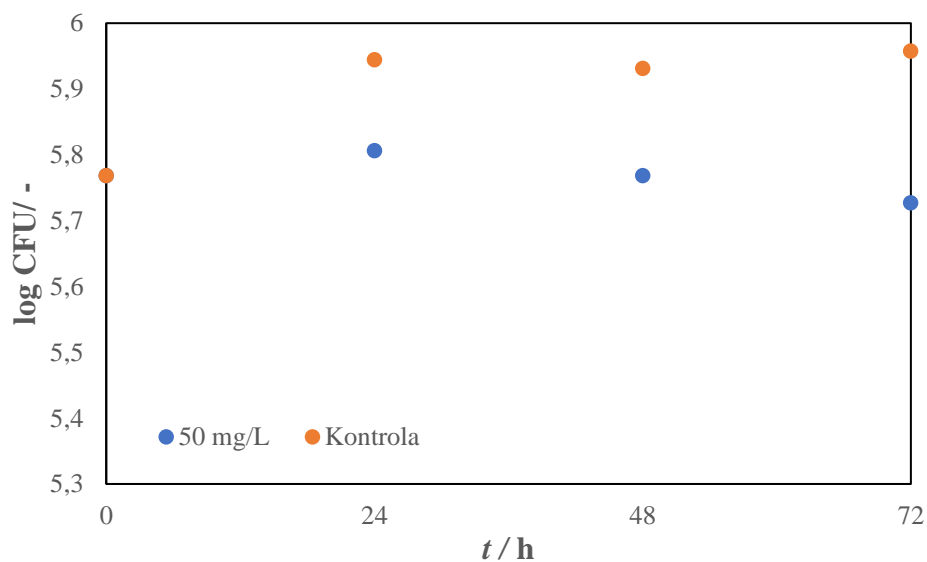
mg/L, CFU vrijednosti su gotovo jednake onima od kontrolnog uzorka. Cijanidi pri tako niskim koncentracijama nemaju značajan učinak na rast mikroalge *Chlorella* sp. Mikroalge su poznate po sposobnosti bioremedijacije drugih spojeva uključujući pesticide, ugljikovodike i cijanide, koje koriste kao izvore ugljika i dušika. [59] Sposobnost otpornosti na cijanide, ili iskorištavanja cijanida u otpadnim vodama varira među različitim vrstama algi. [59] Iako bi rast mikroalgi mogao biti prvotno usporen od strane cijanida, neke vrste mikroalgi brzo se prilagođavaju. Također, mikroalge se sastoje od ugljikohidratnih struktura koje imaju sposobnost biosorpcije toksičnih spojeva. [70,71] Dakle, moguće je da pri niskim koncentracijama cijanida mikroalga *Chlorella* sp. apsorbira cijanide u strukturu. Kod koncentracije cijanida od 25 mg/L nakon 48 h dolazi do stabilizacije rasta mikroalgi. Stalna vrijednost ukazuje na to da se mikroalga *Chlorella* sp. uspijeva prilagoditi i ovim uvjetima prisutnosti cijanida. Međutim, kod nešto viših koncentracija primjećuje se pad vrijednosti CFU, što ukazuje na to da više koncentracije cijanida usporavaju, odnosno smanjuju rast mikroalgi. Ovi rezultati sugeriraju kompleksan utjecaj cijanida na rast mikroalge *Chlorella* sp., pri čemu su promjene u rastu osjetljive na promjenu ispitivanih koncentracija i vrijeme izloženosti.



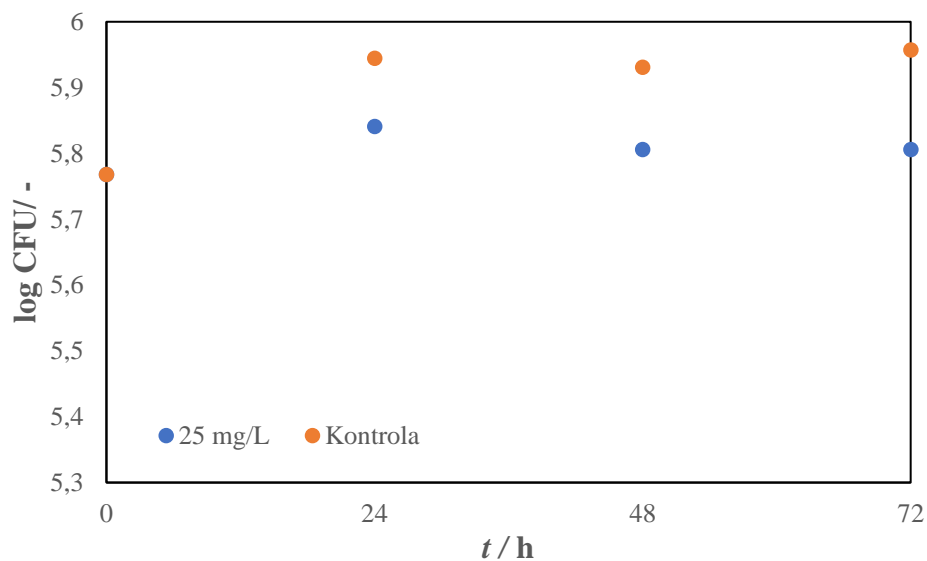
Slika 29. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida 100 mg/L.



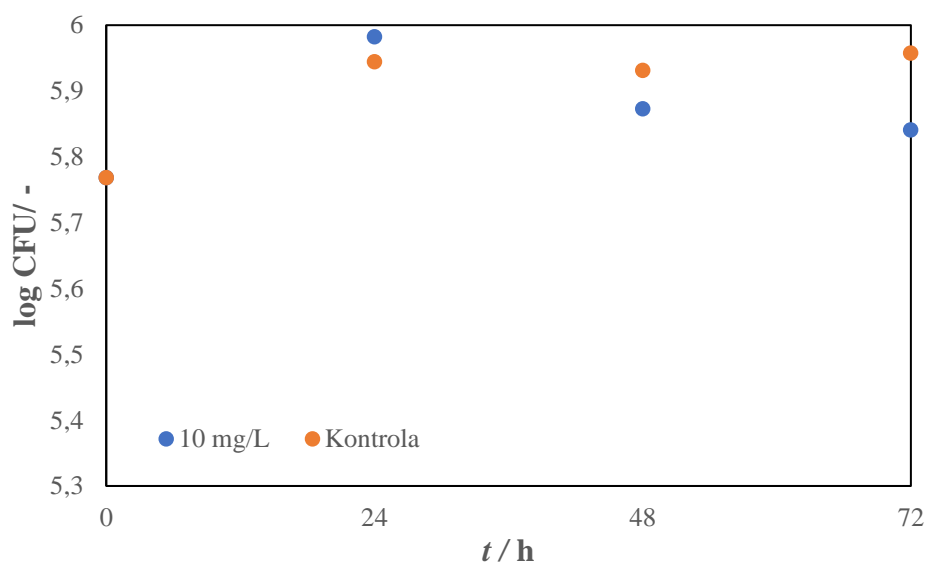
Slika 30. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida 75 mg/L.



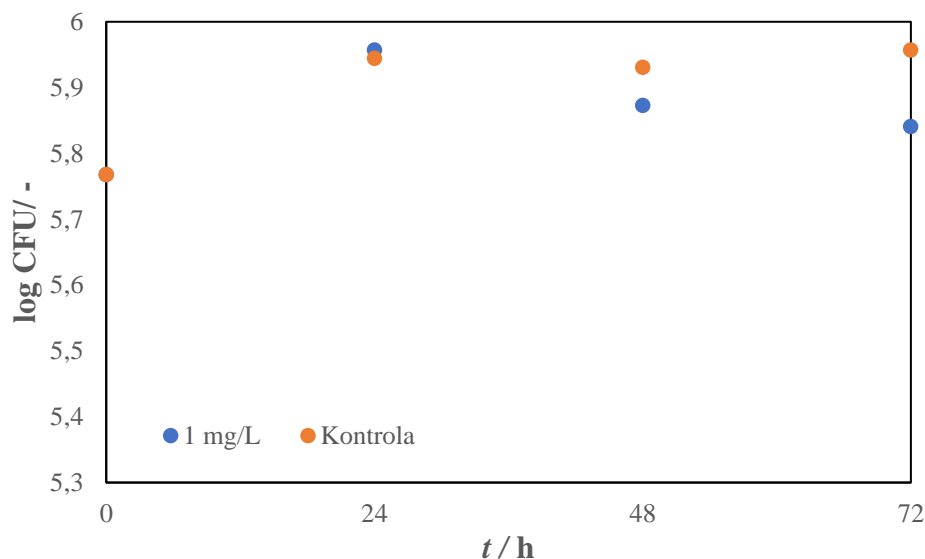
Slika 31. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida 50 mg/L.



Slika 32. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida 25 mg/L.



Slika 33. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida 10 mg/L.

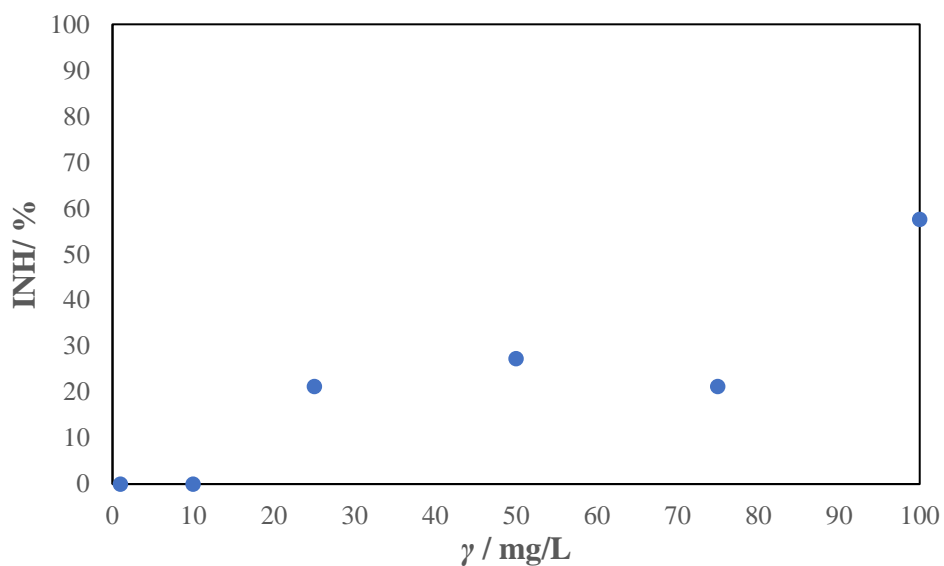


Slika 34. Promjena logaritamskog broja ukupnog broja živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h izlaganja koncentraciji cijanida 1 mg/L.

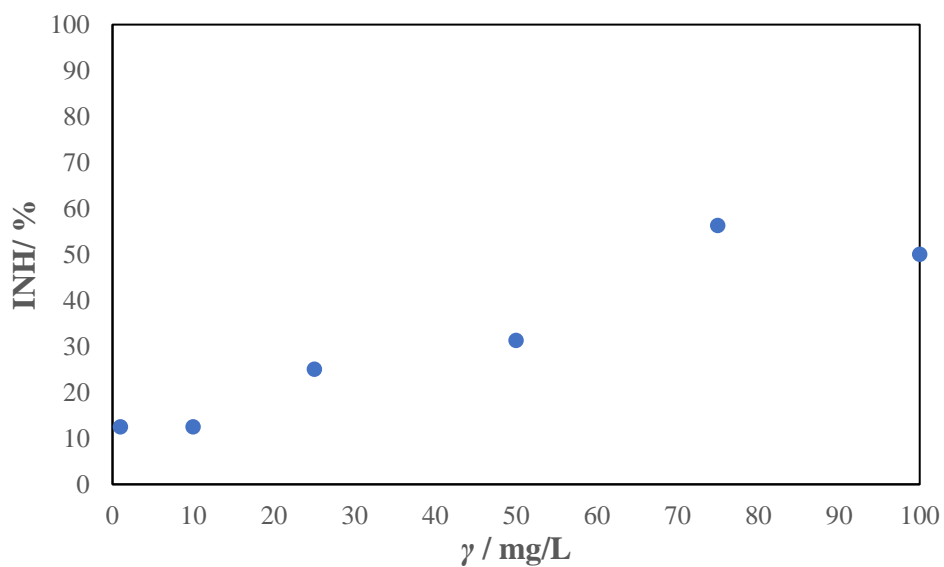
4.2.2. Inhibicija rasta mikroalge *Chlorella* sp.

Inhibicija rasta mikroalge *Chlorella* sp. izračunata je primjenom jednadžbe (2), koristeći CFU vrijednosti za uzorke s koncentracijama cijanida od 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L tijekom razdoblja od 24 h, 48 h i 72 h. Grafički prikaz ovisnosti postotka inhibicije o masenoj koncentraciji prikazan je putem tri grafa. U prvom grafu (Slika 35.) prikazana je ovisnost postotka inhibicije o masenoj koncentraciji cijanida nakon 24 h. Primjećuje se nedostatak inhibicije pri koncentracijama nižim od 25 mg/L, nakon čega slijedi postupan rast postotka inhibicije. Koncentracija od 75 mg/L pokazuje privremeni pad inhibicije, dok se nagli rast postotka inhibicije opaža s povećanjem koncentracije cijanida na 100 mg/L. Dakle, za koncentracije ispod 75 mg/L nije uočena značajna razlika u učinku na inhibiciju rasta mikroalge *Chlorella* sp. Učinak se povećavao s povećanjem koncentracije cijanida, postižući maksimalnu inhibiciju od 58 % nakon 24 h. Drugi graf (Slika 36.) prikazuje rezultate nakon 48 h. Slično kao i u prethodnom slučaju, niske koncentracije od 1 mg/L i 10 mg/L cijanida ne pokazuju značajan učinak, dok se s povećanjem koncentracije bilježi postupan rast inhibicije. Maksimalna inhibicija od 56 % opažena je pri koncentraciji od 75 mg/L, nakon čega postotak opada. Čini se da je postignuta maksimalna koncentracija pri kojoj cijanidi utječu na rast mikroalge *Chlorella* sp. Rezultati nakon 72 h (Slika 37.) pokazuju da koncentracija od 75 mg/L ipak nije dosegla svoj maksimum u ovom vremenskom razdoblju. Nakon 72 h, prisutna je inhibicija rasta mikroalge već i pri 1 mg/L cijanida. Najveća inhibicija rasta mikroalge *Chlorella* sp. opažena je nakon 72 h pri koncentraciji cijanida od 100 mg/L, dosežući 71 %. Ovi rezultati

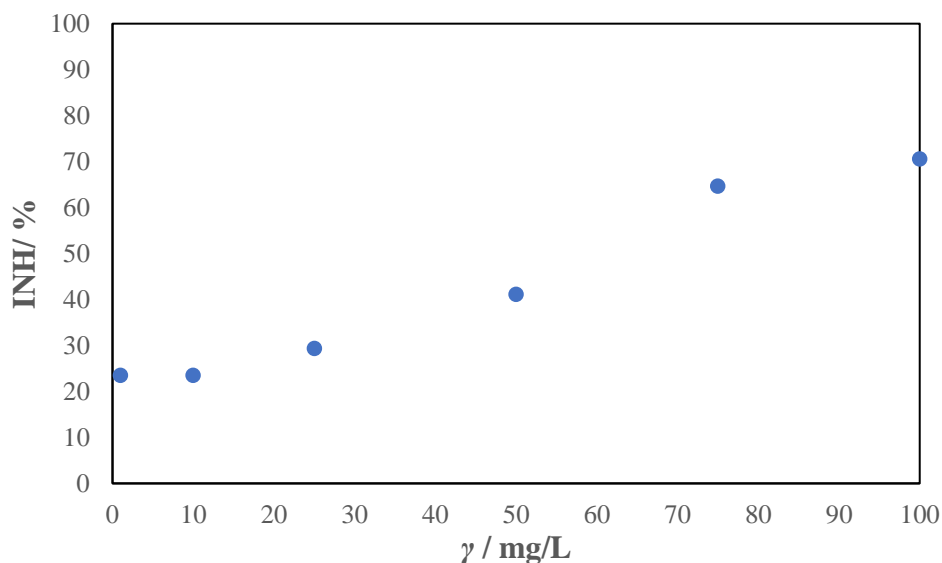
ukazuju na značajan utjecaj prisutnosti cijanida na rast mikroalge *Chlorella* sp., pri čemu inhibicija rasta postaje značajna čak i pri nižim koncentracijama, što sugerira potencijalno velik toksični učinak.



Slika 35. Doza odgovor krivulja dobivena nakon 24 h izlaganja mikroalge *Chlorella* sp. ispitivanim koncentracijama cijanida.



Slika 36. Doza odgovor krivulja dobivena nakon 48 h izlaganja mikroalge *Chlorella* sp. ispitivanim koncentracijama cijanida.



Slika 37. Doza odgovor krivulja dobivena nakon 72 h izlaganja mikroalge *Chlorella* sp. ispitivanim koncentracijama cijanida.

4.2.3. Procjena EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti

EC₂₀ i EC₅₀ također su korišteni za određivanje ekotoksičnosti cijanida. Konkretno, u slučaju mikroalge *Chlorella* sp., EC₂₀ predstavlja koncentraciju cijanida koja uzrokuje određeni štetni učinak kod 20 % mikroalge, dok EC₅₀ označava koncentraciju cijanida koja izaziva štetni učinak kod 50 % mikroalge *Chlorella* sp. Vrijednosti su određene linearizacijom eksperimentalnih podataka, odnosno linearizacijom postotaka inhibicije rasta u ovisnosti o logaritamskoj vrijednosti masenih koncentracija cijanida. Korištenjem jednadžbe pravca, procijenjene su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti. Postupak je isti onomu za bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida*. Rezultati postupka linearizacije prikazani su tablicom 7. Korištenjem jednadžbu pravca, koncentracija EC₂₀ i EC₅₀ izračunate su i prikazane u tablici. Vrijednost EC₅₀ određuje koncentraciju cijanida od 43,02 mg/L kao štetnu za rast 50 % mikroalgi, dok je koncentracija koja uzrokuje štetni učinak cijanida na rast 20 % mikroalgi 9,99 mg/L.

Tablica 7. Procijenjene EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti dobivene nakon izlaganja mikroalge *Chlorella* sp. ispitivanim koncentracijama cijanida.

	γ / mg/L
EC ₂₀	9,99
EC ₅₀	43,02

4.3. Usporedba rezultata

Ispitivanje ekotoksičnosti cijanida provedeno je eksperimentima na testnim organizmima, odnosno bakteriji *Pseudomonas putida* i mikroalgi *Chlorella* sp. Oba mikroorganizma pokazuju slične početne reakcije na prisutnost cijanida, s padom CFU vrijednosti pri čemu je *Pseudomonas putida* osjetljivija na niže koncentracije cijanida u usporedbi s *Chlorella* sp. Međutim, *Pseudomonas putida* pokazuje sposobnost prilagodbe na niske koncentracije cijanida, što se očituje blagim rastom CFU vrijednosti nakon 72 h. S druge strane, *Chlorella* sp. također pokazuje prilagodbu, ali je ta prilagodba osjetljivija na promjene koncentracije i vrijeme izloženosti. Mikroorganizmi pokazuju različite obrasce inhibicije rasta pod utjecajem cijanida. *Pseudomonas putida* posjeduje prilagodbu na stres uzrokovan cijanidima, s efektom hormeze pri niskim koncentracijama, dok se kod mikroalge *Chlorella* sp. javlja visok stupanj inhibicije rasta pri višim koncentracijama cijanida i ona raste s vremenom. Bakterija *Pseudomonas putida* ima višu inicijalnu inhibiciju (nakon 24 h), što ukazuje da je u početnim fazama izlaganja bila osjetljivija na cijanide u usporedbi s mikroalgom *Chlorella* sp. Međutim, mikroalge su postigle višu inhibiciju nakon 72 h, što sugerira da su također značajno pogođene štetnim učinkom cijanida, ali su njihovi učinci postali vidljiviji tek nakon duljeg vremena izlaganja. Usporedba EC_{20} i EC_{50} vrijednosti za *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp. pokazuje da cijanidi imaju štetan učinak na oba testna organizma već pri koncentracijama cijanida nižim od 50 mg/L.

5. ZAKLJUČAK

Cijanidi, toksični spojevi poznati po svojoj velikoj reaktivnosti i sposobnosti bioakumulacije, sve su učestaliji sudionici u nizu industrijskih procesa. Iako su u određenoj količini prisutni i u prirodi, ljudsko djelovanje i industrijski procesi znatno su doprinijeli ispuštanju raznih spojeva cijanida u komponente okoliša, odnosno u tlo, zrak i vodu. Glavni izvori cijanida u vodi su cijanidi dospjeli iz otpadnih industrijskih voda. Osim štetnog učinka na okoliš, prisutna je i opasnost za žive organizme, pa tako i za ljude. Cijanide je nužno pravovremeno detektirati, kako bi se ukloniti iz otpadnih voda i tako očuvala sigurnost voda i vodenih organizama. Ovaj rad bavi se ispitivanjem ekotoksičnosti cijanida u vodama. Ispitivanje ekotoksičnosti u ovome radu provedeno je na dva testna organizma – bakteriji *Pseudomonas putida* i mikroalgi *Chlorella* sp. Ispitivane koncentracije cijanida bile su: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L. Prije provedbe eksperimenata uzgojene su bakterijska kultura i mikroalge u potrebnim uvjetima temperature i pH – vrijednosti. Tijekom eksperimenata određivane su CFU vrijednosti, na temelju kojih su izračunati postotci inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp. u trajanju od 72 h. Vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ procijenjene su na temelju podataka dobivenih tijekom provedbe eksperimenta. CFU vrijednosti pokazuju da s povećanjem koncentracije cijanida dolazi do značajnog smanjenja broja živih stanica *Pseudomonas putida*. Najveće smanjenje CFU vrijednosti opaženo je kod koncentracija 100 mg/L i 75 mg/L, koje ukazuje na visoku osjetljivost na cijanide. Određivanjem CFU vrijednosti za mikroalgu utvrđeno je da niže koncentracije cijanida (10 mg/L i 1 mg/L) nemaju značajan utjecaj na rast mikroalge, ali više koncentracije uzrokuju pad broja živih stanica. Inhibicija rasta bakterijske kulture najveća je pri koncentraciji 100 mg/L nakon 24 h, u iznosu od 75 %. Postotak inhibicije smanjuje se s vremenom, što sugerira na efekt hormeze pri nižim koncentracijama, ali visoke koncentracije cijanida i dalje imaju značajan utjecaj. U slučaju mikroalge *Chlorella* sp., prisutan je sličan trend, gdje niže koncentracije ne uzrokuju značajnu inhibiciju, a najveća inhibicija od 71 % opažena je pri koncentraciji cijanida od 100 mg/L nakon 72 h. EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti također potvrđuju visoku osjetljivost bakterije *Pseudomonas putida* na cijanide, pri čemu EC₅₀ iznosi 29,57 mg/L, a EC₂₀ iznosi 5,04 mg/L. Ove vrijednosti ukazuju na to da cijanidi imaju štetan učinak na bakteriju već pri relativno niskim koncentracijama. Za mikroalgu *Chlorella* sp. te su vrijednosti nešto veće i EC₅₀ iznosi 43,02 mg/L, a vrijednost EC₂₀ iznosi 9,99 mg/L. Cijanidi imaju značajne štetne učinke na bakteriju *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp. te time i potencijalni rizik od štetnog učinka u vodenim ekosustavima. Rezultati naglašavaju potrebu za strogim praćenjem i regulacijom ispuštanja cijanida u prirodne vodene površine.

6. POPIS OZNAKA I SIMBOLA

BPK – biokemijska potrošnja kisika [g]

CFU – broj živih stanica bakterije (eng. *Colony Forming Units*) [stanica/mL]

EC₂₀ – efektivna a koncentracija koja izaziva negativan utjecaj na 20 % ispitivane populacije [mg/L]

EC₅₀ – efektivna a koncentracija koja izaziva negativan utjecaj na 50 % ispitivane populacije [mg/L]

ICP-MS – masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom

INH – inhibicija rasta [%]

K – broj velikih kvadrata Thomine komorice

KPK – kemijska potrošnja kisika [g]

LC₅₀ – koncentracija tvari u okolišu koja je smrtonosna za 50% testiranih organizama

LOEC – najniža koncentracija tvari pri kojoj se primjećuju statistički značajni štetni učinci na testiranom organizmu

m – broj prebrojanih stanica

N – ukupan broj živih stanica mikroalgi u 1 mL [st/mL]

n – razrjeđenje

NOEC – najviša koncentracija tvari pri kojoj se ne primjećuju statistički značajni štetni učinci na testiranom organizmu

OG – optička gustoća

T – temperatura [°C]

t – vrijeme [h]

λ – valna duljina [m]

γ – masena koncentracija [mg/L]

7. LITERATURA

- [1] Egekeze J. O., Oehme F. W., (1980), Cyanides and their toxicity: A literature review, *Veterinary Quarterly*, 104-114.
- [2] Schnepf R., (2006), Cyanide: Sources, perceptions, and risks. *Journal of Emergency Nursing*, 32, 3-7.
- [3] W. B., (2023), Cyanide – Definition, Formula & Symbol, *Study.com*, <https://study.com/academy/lesson/what-is-cyanide-definition-formula-effects.html> (pristup: 08. studenog 2023.)
- [4] Kaushik, R., Ghosh, A., Singh, A., Gupta, P., Mittal, A., & Jose, D. A. (2016). Selective detection of cyanide in water and biological samples by an off-the-shelf compound. *ACS Sensors*, 1-8.
- [5] Volke, D. C., Calero, P., Nickel, P. I., (2020), *Pseudomonas putida*, *Trends in Microbiology*, 28(16), 512-513.
- [6] Abreu A.P., Martins R., Nunes J., (2023), Emerging Applications of *Chlorella* sp. and *Spirulina* (*Arthrospira*) sp., *Bioengineering*, 10, 955, 1-34.
- [7] Dash R. R., Gaur A., Balomajumder C., (2009), Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment, *Journal of Hazardous Materials*, 163, 1-11.
- [8] Baud F. J., (2007), Cyanide: critical issues in diagnosis and treatment, *Human & Experimental Toxicology*, 26, 191-201.
- [9] Jaszczak E., Polkowska Z., Narkowicz S., Namieśnik J., (2017), Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges, *Environ Sci Pollut Res*, 24, 15929–15948.
- [10] Pandviir P. E., Banks E. C., (2015), The latest developments in quantifying cyanide and hydrogen cyanide, *Trends in Analytical Chemistry*, 64, 75-85.
- [11] Wild S. R., Rudd T., Neller A., (1994), Fate and effects of cyanide during wastewater treatment processes, *The Science of the Total Environment* 156, 93-107.
- [12] Dzombak D. A., Ghosh S. R., Wong – Chong M. G., (2006), *Cyanide in Water and Soil*, Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
- [13] Manar R., Bonnard M., Rast C., Veber A., Vasseur P., (2011), Ecotoxicity of cyanide complexes in industrially contaminated soils, *Journal of Hazardous Materials*, 197, 369-377.
- [14] Ogbuagu O. E., Airaodion A., I., Okoroukwu V. N., Ogbuadu U., Ekenjoku J. A., (2019), Cyanide Toxicity: The Good, the Bad and the Ugly, *International Journal of Bio Science and Bio Technology*, 157-164.

- [15] Kumar R., Saha S., Dhaka S., Kurade M. B., Kang C. U., Baek S. H., Jeon B. H., (2016), Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives, *Geosystem Engineering*, 1-17.
- [16] Newman M. C., (2015), *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*, Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
- [17] Walker C. H., Sibly R. M., Hopkin S. P., Peakall D. B., (2012), *Principles of Ecotoxicology*, Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
- [18] Amaud C., (2007), *Electron-Starved Enzyme*, Chemical & Engineering News, <https://pubsapp.acs.org/cen/news/85/i12/8512notw4.html> (pristup: 02. prosinca 2023.)
- [19] Taylor J. Roney N., Harper C., (2005), Toxicological profile for cyanide,
- [20] Deal R., (2019), *Cyanide Destruction: A New Look at an Age-Old Problem*, Products Finishing, <https://www.pfonline.com/articles/cyanide-destruction-a-new-look-at-an-age-old-problem> (pristup: 13. prosinca 2023.)
- [21] Patil Y. B., Paknikar K. M., (2000), Development of a process for biodegradation of metal cyanides from waste waters, *Process Biochemistry*, 35, 1139-1151.
- [22] Young C. A., Jordan T. S., (1995), Cyanide Remediation: Current And Past Technologies, *Great Plains/Rocky Mountain Hazardous Substance Research Center*, 104-129.
- [23] Naveen D., Majumder C. B., Mondal P., Shubha D., (2011), Biological Treatment of Cyanide Containing Wastewater, *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(7), 15-21.
- [24] Rivera A. A., Hoyos S. G., Buitrón G., Sarasvathi P. T., Ortega G. R., (2021), Biological treatment for the degradation of cyanide: A review, *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1418-1433.
- [25] Chapman J. C., (1995), The role of ecotoxicity testing in assessing water quality, *Australian Journal of Ecology*, 20, 20-27.
- [26] Elenbass M., (2013), *Daphnia Magna*, Animal Diversity Web, https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/ (pristup: 13. siječnja 2024.)
- [27] Bender E., (2022), *Urban evolution: How species adapt to survive in cities*, Knowable Magazine, <https://knowablemagazine.org/content/article/living-world/2022/urban-evolution-species-adapt-survive-cities> (pristup: 13. siječnja 2024.)
- [28] https://www.craiyon.com/image/dTtv_FWMSmiarh4lTrINMg (pristup 13. siječnja 2024.)
- [29] Baek Y. W., Kim E., Sun K. Y., Ro H. Y., Kim H. M., Eom I. C., Yong W., Kim P. J., (2011), OECD High Production Volume Chemicals Program: Ecological Risk Assessment of Copper Cyanide, *Korean J. Limnol*, 44(3), 272-279.

- [30] <https://connectfishfriends.com/blogs/japanese-ricefish-oryzias-latipes-conservation-status-japan> (pristup: 21. travnja 2024.)
- [31] <https://animal-world.com/moonlight-medaka/> (pristup: 21. travnja 2024.)
- [32] <https://aquaticarts.com/collections/pond-fish-1/products/assorted-medaka-ricefish> (pristup: 23. travnja 2024.)
- [33] Lotfi S., Ahmadi S., Kumar P., (2022), Ecotoxicological prediction of organic chemicals toward *Pseudokirchneriella subcapitata* by Monte Carlo approach, *RSC Advances*, 12, 24988-24997
- [34] *Raphidocelis subcapitata*, (2023), Alchetron, <https://alchetron.com/Raphidocelis-subcapitata> (pristup: 1. ožujka 2024.)
- [35] Sapkota A., (2022), *Pseudomonas putida- An Overview*, Microbe Notes, <https://microbenotes.com/pseudomonas-putida/> (pristup: 18. studenog 2023.)
- [36] Wackett, L. P., (2003), *Pseudomonas putida*—a versatile biocatalyst, *Nature Biotechnology*, 21, 136-138.
- [37] <https://www.bug.hr/znanost/bakterije-koje-jedu-sve--rjesenje-za-recikliranje-plastike-30155> (pristup: 21. studenog 2023.)
- [38] Raghavan, P. U., Vivekanandan M., (1999), Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted *Pseudomonas putida*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(1), 29–32.
- [39] Nikel P. I., Lorenzo V., (2018), *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism, *Metabolic Engineering*, 50, 142-155.
- [40] Loeschcke A., Thies S., (2015), *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 6197–6214.
- [41] Weimer A., Kohlstedt M. Volke D. C., Nikel P. I., Wittmann C., (2020), Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7745–7766.
- [42] Grigor'eva N. V., Kondrat'eva T. F., Krasil'nikova E. N., Karavaiko G. I., (2006), Mechanism of Cyanide and Thiocyanate Decomposition by an Association of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* Strains, *Mikrobiologiya*, 75(3), 320-328.
- [43] Singh U., Arora N. K., Sachan P., (2018), Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 38-44.

- [44] Werlen C., Jaspers M. C. M., Meer J. R., (2004), Measurement of Biologically Available Naphthalene in Gas and Aqueous Phases by Use of a *Pseudomonas putida* Biosensor, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 43-51.
- [45] Chang W. S., Mortel M., Nielsen L., Guzman G. N., Li X., Halverson L. J., (2007), Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions, *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8290–8299.
- [46] Khashei S., Etemadifar Z., Rahmani H. R., (2019), Multifunctional Biofertilizer from *Pseudomonas Putida* PT: A Potential Approach for Simultaneous Improving Maize Growth and Bioremediation of Cadmium-polluted Soils, *Journal of Microbial Biology*, 8(32), 117-129.
- [47] Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I., (2006), Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 137-144.
- [48] Akcil A., Karahan A. G., Ciftci H., Sagdic O., (2003), Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.), *Minerals Engineering*, 16, 643–649.
- [49] Igeño M. I., Becerra G., Guijo M. I., Merchán F., Blasco R., (2011), Metabolic adaptation of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 to cyanide: role of malate–quinone oxidoreductases, aconitase and fumarase isoenzymes, *Biochemical Society Transactions*, 39(6) 1849-1853.
- [50] Chapatwala K. D., Babu G. R. V., Vijaya O. K., Kumar K. P., Wolfram J. H., (1998), Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 28-33.
- [51] Dash R. R., Gaur A., Balomajumder C., (2009), Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment, *Journal of Hazardous Materials*, 163, 1-11.
- [52] Mitra S., Holz R. C., (2007), Unraveling the Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratases, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7397-7404.
- [53] Masojídek J., Torzillo G., (2014), Mass Cultivation of Freshwater Microalgae, Reference Module in *Earth Systems and Environmental Sciences*, 1-13.
- [54] Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P. Y., Garcia C. V., (2014), Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- [55] <https://www.teregroup.it/en/chlorella/> (pristup: 11. studenog 2023.)

- [56] Santos F. M., Goncalves A. L., Pires J. C. M., (2019), Negative emission technologies, *Bioenergy with Carbon Capture and Storage*, 1-13.
- [57] Abdelfattah A., Ali S. S., Ramadan H., Aswar E. I. E., Eltawab R., Ho A. H., Elsamahy T., Li S., Sheekh M. M. E., Schager M., Kornaros M. Sun J., (2023), Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects, *Environmental Science and Ecotechnology*, 13, 1-18.
- [58] Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Allah E. F. A., (2019), Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 709-722.
- [59] Abreu A. P., Martins R., Nunes J., (2023), Emerging Applications of *Chlorella* sp. and *Spirulina* (*Arthrospira*) sp., *Bioengineering*, 10, 955.
- [60] Widyaningrum D., Prianto A. D., (2021), *Chlorella* as a Source of Functional Food Ingredients: Short review, *Earth and Environmental Science*, 794, 1-7.
- [61] Silva J., Alves C., Pinteus S., Reboleira J., Pedrosa R., Bernardino S., (2019), *Chlorella*, *Elsevier Inc.*, 3(10), 187-193.
- [62] Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wang Y., Ruan R., (2009), Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant, *Humana Press*.
- [63] Ravikumar Y, Razack S. A., Yun J., Zhang G., Zabed H. M., Qi X., (2021), Recent advances in Microalgae-based distillery wastewater treatment, *Environmental Technology & Innovation*, 24, 2-10.
- [64] Jackrel S., Narwani A., Bentlage B., Kevine R B., Hietala D. C., Savage P. E., Oakley T. H. Denev V. J., Cardinale B. J., (2018), Ecological engineering helps maximize function in algal oil production, *Applied and Environmental Microbiology*, 84(15), 1-16.
- [65] Liu, Q., Zhang, G., Ding, J., (2018), Evaluation of the Removal of Potassium Cyanide and its Toxicity in Green Algae (*Chlorella vulgaris*), *Bull Environ Contam Toxicol*, 100, 228–233.
- [66] ISO 10712, (1995), Water quality—*Pseudomonas putida* growth inhibition test pseudomonas cell multiplication inhibition test, <https://www.iso.org/standard/18800.html> (pristup: 23. srpnja 2024.)
- [67] OECD (1984), Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- [68] OECD (2011), Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

- [69] <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/hormesis>
(pristup: 20. lipnja 2024.)
- [70] Hammed A. M., Prajapati S. K., Simsek S., Simsek H., (2016), Growth regime and environmental remediation of microalgae, *Algae*, 31(3), 189-204.
- [71] Aksu Z., Calik A., (2007), A Comparative Study of the Biosorption of Iron(III)—Cyanide Complex Anions to *Rhizopus arrhizus* and *Chlorella vulgaris*, *Separation Science and Technology*, 34(5), 817-832.

8. ŽIVOTOPIS

Donna Danijela Dragun [REDACTED] Osnovnu školu Julija Benešića u Iloku završava 2015. g., kada završava i Osnovnu glazbenu školu Josipa Runjanina u Vukovaru, smjer klavir, te školu stranih jezika Linguapax Vinkovci. Iste godine upisuje Opću gimnaziju u Srednjoj školi Ilok te Srednju glazbenu školu Josipa Runjanina u Vinkovcima, smjer solo pjevanje. Uz školu, vrijeme provodi volontirajući u domu za stare i nemoćne te vodeći emisiju na Radio Iloku. Preddiplomski sveučilišni studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2019. g., a po završetku upisuje diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša 2022. g. Tijekom diplomskog studija, 2023. g., sudjeluje kao demonstratorica na Zavodu za mjerenje i vođenje procesa. Slobodno vrijeme ispunjava pjevanjem, sviranjem klavira, slikanjem, fotografijom i učenjem stranih jezika.