

Određivanje štetnog učinka rodanida na okoliš

Bubaš, Pamela

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:601896>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Pamela Bubaš

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

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

Kandidatkinja **Pamela Bubaš**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 18. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Martina Miloloža, 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: 23. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Pamela Bubaš

ODREĐIVANJE ŠTETNOG UČINKA RODANIDA NA OKOLIŠ

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva: dr. sc. Lidija Furač

dr. sc. Martina Miloloža

Zagreb, rujan 2024.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na stručnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada i na pruženoj prilici za izradu istoga. Hvala Vam na susretljivosti i strpljenju, kao i na inspirativnim predavanjima kojima ste me zainteresirali za područje ekologije i zaštite okoliša.

Zahvaljujem asistentici dr. sc. Martini Miloloži na vedrom duhu, trudu, pomoći i strpljenju tijekom rada u laboratoriju, kao i na savjetima za izradu ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji i bližnjima što su bili uz mene na svakom koraku moga studiranja i što su mi pružili neizmjernu i bezuvjetnu podršku, ljubav i strpljenje tijekom istoga. Također, hvala i mojim prijateljima i kolegama što su mi uljepšali ove studentske dane i učinili ih vedrijima.

Hvala dragom Bogu na svemu!

SAŽETAK

Razvojem civilizacije i industrije povećava se i broj i količina onečišćujućih tvari u okolišu. Prisutnost onečišćujućih tvari u okolišu može se odrediti analizom uzoraka vode, tla, zraka i biote. Praćenje onečišćujućih tvari ključno je za razumijevanje njihovih izvora, putanja i učinaka na okoliš i ono pomaže u donošenju regulacija i strategija za smanjenje njihovog štetnog učinka. Ključnu ulogu u procjeni utjecaja onečišćujućih tvari na okoliš imaju testovi ekotoksičnosti. Oni ispituju kako različite tvari, uključujući industrijske kemikalije, pesticide i farmaceutske proizvode, utječu na ekosustave i organizme prisutne u njima. Uobičajene metode testova ekotoksičnosti su laboratorijski testovi na bakterijama, algama, vodenim beskralježnjacima i ribama, kojima se utvrđuje toksičnost, bioakumulacija i dugoročni učinci na populacije i ekosustave. Ekotoksičnost rodanida, odnosno tiocijanata, u ovom radu ispitana je primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp. Za ispitivanje ekotoksičnosti rodanida pripremljeno je šest različitih koncentracija rodanida, koje su iznosile: $\gamma_{R1} = 1 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R2} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R3} = 25 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R4} = 50 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R5} = 75 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R6} = 100 \text{ mg L}^{-1}$. Kao mjerilo utjecaja rodanida na navedene mikroorganizme određivana je CFU vrijednost, odnosno broj živih stanica mikroorganizama tijekom 72 sata izlaganja i određivani su postotci inhibicije rasta navedene bakterijske kulture i mikroalge. U slučaju bakterijske kulture *Pseudomonas putida*, najveći postotak inhibicije nakon 72 sata izlaganja iznosio je 59,17 %, dok je kod mikroalge *Chlorella* sp. najveći postotak inhibicije iznosio 71,43 %. Dobiveni podaci pokazuju da mikroalga *Chlorella* sp. pokazuje veću osjetljivost na rodanide od bakterijske kulture *Pseudomonas putida*.

Ključne riječi: ekotoksičnost, rodanidi, *Pseudomonas putida*, *Chlorella* sp.

Determination of the harmful effect of rhodanide on the environment

ABSTRACT

Along with the development of civilization and industry, the number and amount of pollutants in the environment increases. The presence of pollutants in the environment can be determined by analyzing samples of water, soil, air and biomes. Monitoring of pollutants is essential to understand their sources, pathways and effects on the environment and it helps to formulate regulation and strategy to reduce their harmful effect. Ecotoxicity tests play a key role in assessing the impact of pollutants on the environment. They examine how various substances, including industrial chemicals, pesticides and pharmaceuticals, affect ecosystems and the organisms present in them. Common methods of ecotoxicity tests are laboratory tests on bacteria, algae, aquatic invertebrates and fish, which determine toxicity, bioaccumulation and long-term effects on populations and ecosystems. In this paper, the ecotoxicity of rhodanide, or thiocyanate, was tested using the bacterial culture of *Pseudomonas putida* and the microalgae *Chlorella* sp. For testing the ecotoxicity of rhodanide, six different concentrations of rhodanide were prepared and applied, which were: $\gamma_{R1} = 1 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R2} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R3} = 25 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R4} = 50 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R5} = 75 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R6} = 100 \text{ mg L}^{-1}$. As a measure of the effect of rhodanide on the mentioned microorganisms, the CFU value, i.e. the number of live cells of microorganisms during 72 hours of exposure, was determined, and the percentages of inhibition of the growth of the mentioned bacterial culture and microalgae were determined. In the case of the bacterial culture *Pseudomonas putida*, the highest percentage of inhibition after 72 hours of exposure was 59,17 %, while in the case of the microalgae *Chlorella* sp. the highest percentage of inhibition was 71,43 %. The obtained data show that the microalgae *Chlorella* sp. shows greater sensitivity to rhodanides than the bacterial culture of *Pseudomonas putida*.

Key words: ecotoxicity, rhodanides, *Pseudomonas putida*, *Chlorella* sp.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Koksna industrija i ostali izvori rodanida	2
2.2. Struktura i svojstva rodanida	4
2.3. Utjecaj rodanida na okoliš	5
2.4. Načini uklanjanja rodanida iz okoliša	6
2.5. Testovi ekotoksičnosti	8
2.5.1. Test ekotoksičnosti s bakterijom <i>Pseudomonas putida</i>	10
2.5.2. Test ekotoksičnosti s mikroalgom <i>Chlorella</i> sp.	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Rodanidi.....	14
3.1.2. Bakterijska kultura <i>Pseudomonas putida</i>	14
3.1.3. Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	15
3.2. Mediji i kemikalije.....	15
3.2.1. Hranjivi agar	16
3.2.2. Fiziološka otopina.....	16
3.2.3. Mineralni medij	16
3.2.4. Bazalni medij.....	17
3.3. Mjerni instrumenti i oprema	17
3.4. Metode rada	19
3.4.1. Priprema otopina rodanida.....	19
3.4.2. Uzgoj bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	19
3.4.3. Uzgoj mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	20
3.4.4. Sterilna tehnika rada	21
3.4.5. Priprema trajnog preparata	21
3.4.6. Određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	22
3.4.7. Određivanje ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	24
4. REZULTATI	26
4.1. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	26
4.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	28
5. RASPRAVA.....	30
5.1. Test ekotoksičnosti promjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	30

5.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	31
5.3. Vrijednosti efektivne koncentracije, EC _x	32
6. ZAKLJUČAK	33
7. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	34
8. LITERATURA	35
9. ŽIVOTOPIS	42

1. UVOD

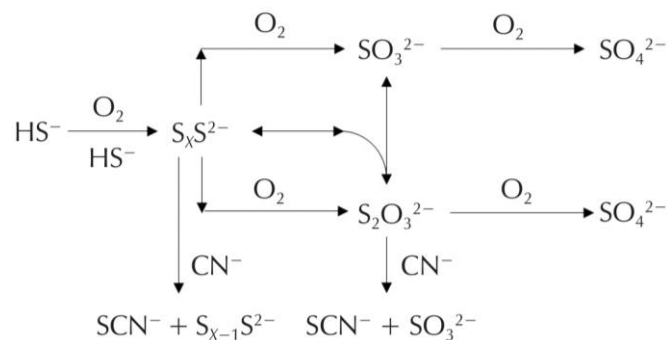
Velika većina globalne proizvodnje čelika provodi se u visokim pećima. One koriste ugljen za redukciju željeznih oksida u rudače, no da bi kvaliteta ugljena bila zadovoljavajuća potrebno ga je pretvoriti u koks, jer koks u usporedbi s ostalim konvencionalnim gorivima, ima veću kalorijsku vrijednost. Zbog velike potrošnje vode, u ovoj vrsti industrije nastaju velike količine otpadne vode koje sadrže značajne količine onečišćujućih i toksičnih tvari, između ostalog i tiocijanate. Iz tog razloga potrebna je posebna pozornost prilikom pročišćavanja takvih voda kako ne bi izazvale onečišćenje okoliša.¹⁻⁶ Osim u procesima koksiranja, tiocijanati nastaju kao onečišćivalo i u rudnicima zlata, tiskarskoj i tekstilnoj industriji, industriji boja, itd. Zbog svega navedenog, može se zaključiti da je tiocijanat sveprisutan u raznim industrijskim otpadnim vodama i samim time predstavlja potencijalan problem koji je potrebno riješiti.⁷ U svrhu poznavanja utjecaja rodanida na okoliš, potrebno je ispitati kakve i koliko ozbiljne posljedice ostavljaju na organizme prisutne u okolišu. Ekotoksikologija je znanstvena disciplina koja proučava indirektni ili direktni utjecaj ksenobiotika na ekosustave, na žive organizme i njihovu organizaciju te na odnos ksenobiotika prema neživoj tvari, na njihove međusobne odnose i odnos prema čovjeku.⁸ Ekotoksikološki testovi provode se na širokom spektru organizama kao što su: bakterijske vrste *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* i *Vibro fischeri*⁹, zelene alge *Chlorella* sp., *Raphidocelis subcapitata*^{10,11}, vodene biljke *Lemna minor* i *Myriophyllum spicatum*¹², vodeni beskralježnjaci kao što je *Daphnia magna*¹³, kopneni beskralježnjaci kao što je *Eisenia fetida*¹⁴, slatkovodna riba *Danio rerio*¹⁵, morska riba *Pimephales promelas*¹⁶, vodozemac *Xenopus laevis*¹⁷, manje primjenjivani gmazovi kao što su kornjače i gušteri¹⁸, ptice¹⁹ i sisavci kao što su štakori i miševi²⁰.

U ovom radu ispitan je ekotoksični utjecaj rodanida, odnosno tiocijanata, na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp. Tijekom tri dana mikroorganizmi su bili izloženi različitim koncentracijama rodanida i određena je potencijalna inhibicija rasta bakterijskih stanica, odnosno stanica mikroalgi. Rast stanica mikroorganizama pratio se prema principu brojanja stanica tijekom i nakon izlaganja onečišćujućoj tvari, točnije stanice su brojane u 24., 48. i 72. satu izlaganja. Iz dobivenih rezultata prikazane su grafičke ovisnosti logaritamske vrijednosti ukupnog broja živih stanica mikroorganizma o vremenu. Također su procijenjene EC₅₀ i EC₂₀ vrijednosti. Na taj je način dobivena slika o mogućem utjecaju rodanida na okoliš.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Koksna industrija i ostali izvori rodanida

Koksna industrija je industrija proizvodnje koksa gdje se provodi proces zagrijavanja ugljena bez prisustva zraka na temperature iznad 600 °C kako bi se uklonile hlapljive komponente iz sirovog ugljena. Kao ostatak tog procesa dobiva se kruti i porozni materijal s visokim udjelom ugljika, tzv. koks.²¹⁻²⁴ Koks se koristi kao gorivo u proizvodnji čelika zbog svoje velike kalorijske vrijednosti u usporedbi s konvencionalnim gorivima, poput drva ili nafte, koristi se i kako bi se postigla potrebna kvaliteta ugljena za proizvodnju čelika, kao i za redukciju željeznih oksida. Kako je industrija željeza i čelika najveći potrošač svježe vode, proizvodnja koksa izravno je povezana sa stvaranjem značajnih količina otpadnih voda, koje se nazivaju otpadne vode od koksiranja, a nastaju ispiranjem koksa i kondenzacijom koksnog plina.¹⁻⁵ Takve otpadne vode od koksiranja sadrže značajne količine cijanida, fenola, klorida, aluminijskih soli i tiocijanata, zbog čega se sa ekološkog gledišta smatraju jednim od najtoksičnijih industrijskih otpadnih voda koje uzrokuju akutnu toksičnost popraćenu genotoksičnošću ako se ispuštaju u prirodne vode bez odgovarajućeg tretmana. Uz značajan utjecaj na okoliš, otpadne vode od koksiranja imaju značajan utjecaj i na zdravlje zaposlenika poduzeća, ali i zaposlenike susjednih poduzeća.^{3,25} Kako bi se izbjeglo ozbiljno onečišćenje okoliša i utjecaj na kvalitetu površinskih vodnih tijela i podzemnih voda, kao i vodenog svijeta pa čak i prehrambenog lanca, posebna se pozornost posvećuje pročišćavanju takvih otpadnih voda prije ispuštanja u vanjski okoliš.^{23,6} Tiocijanat (SCN⁻) opasna je i kemijski stabilna onečišćujuća tvar koja nastaje u reakciji cijanida i sumpora u procesu proizvodnje koksa pri visokim temperaturama. Moguće reakcije prikazane su na slici 1. U otpadnim vodama od koksiranja, tiocijanat čini oko 15% ukupne kemijske potrošnje kisika (KPK).²⁶⁻²⁹



Slika 1. Moguće reakcije nastajanja tiocijanata u otpadnim vodama koksne industrije.³⁰

Postoje razni spojevi metalnih tiocijanata. Jedan od njih je i bakrov(I) tiocijanat (CuSCN) koji je koordinacijski polimer temeljen na prenosnom SCN-u. On je snažno utjecao na napredak optoelektroničke primjene, počevši od fotosenzibilnih solarnih ćelija i srodnih tehnologija, korišten je kao provodnik za fotosenzibilne solarne ćelije u čvrstom stanju, solarne ćelije s ekstremno tankim apsorberom i solarne ćelije osjetljive na kvantne točke. Dodatne optoelektrične primjene CuSCN-a ostvarene su u organskim fotonaponskim ćelijama, perovskitnim solarnim ćelijama, organskim svjetlećim diodama i tankoslojnim tranzistorima. Širokoj primjenjivosti CuSCN-a pridonose optička prozirnost, dobre karakteristike prijenosa šupljina i mogućnost obrade otopine na niskim temperaturama. Bakrov(I) tiocijanat samo je jedan primjer metalnog tiocijanata, uz njega postoje mnogi drugi koji su do sada neistraženi. Također, tiocijanatni spojevi postaju tehnološki relevantni zbog čega je važno istražiti i druge metalne tiocijanatne spojeve kako bi se razumjeli odnosi između njihovih kemijskih, strukturnih i elektroničkih svojstava.³¹

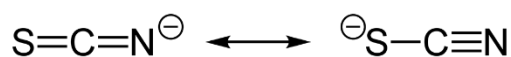
Tiocijanat je također i biomarker izloženosti cijanidu iz duhanskog dima, prehrane ili industrijskog onečišćenja okoliša cijanidom.^{32,33,34} Stvara se u tijelu kao metabolit cijanida iz duhanskog dima ili cijanogene hrane kao što je manioka, a izloženost toksičnim razinama cijanida može biti rezultat brojnih kemijskih reakcija. Tiocijanat se u nižim koncentracijama može naći u mlijeku, mliječnim proizvodima i nekom povrću. Tiocijanati mogu poremetiti funkciju štitnjače kompetitivnom inhibicijom unosa jodida tako što se mogu reverzibilno vezati na protein simporter natrijeva jodida što rezultira smanjenom apsorpcijom joda u štitnjači. Ovaj mehanizam čini tiocijanat jednim od najvažnijih spojeva iz okoliša koji utječu na pojavu bolesti štitnjače.^{32,33}

Još jedan spoj tiocijanata je i kalijev tiocijanat, KSCN, koji se može koristiti kao izbjeljivač i kao dezinficijens, a koristi se i u kombinaciji sa drugim spojevima, primjerice heterocikličkim spojevima i organskim kationima, kao inhibitor korozije za suzbijanje kiselinske korozije metala u različitim poljima kao što su čelični spojevi konstrukcija, zatim acidizacija naftnih bušotina, kiselo dekapiranje, kiselo čišćenje itd., jer poboljšavaju sposobnost adsorpcije organskih kationa stvaranjem mosta između pozitivno nabijene površine čelika i organskih kationa u kiselom mediju.^{35,36}

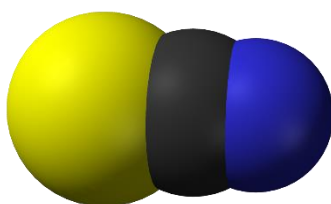
Tiocijanati imaju primjenu i kao sredstva za ispiranje pri ekstrakciji zlata i srebra, za rasplinjavanje ugljena, kao kontaktni herbicidi za kontrolu korova i nepoželjnih biljaka, itd., što dovodi do pojave tiocijanatnih otpadnih voda koje izazivaju zabrinutost za okoliš.³⁷

2.2. Struktura i svojstva rodanida

Tiocijanati, poznati kao i rodanidi, soli su tiocijanske kiseline (HSCN) (slike 2 i 3). Opća formula njihovih spojeva je $M^I\text{-SCN}$, odnosno $R\text{-SCN}$, gdje M^I označava jednovalentni metal, a R alkilnu skupinu. Molekulska formula spoja je SCN^- , a molarna masa iznosi 58,0824 g mol⁻¹.³⁸



Slika 2. Rezonantne strukture tiocijanatnog iona.



Slika 3. Kalotni model tiocijanatnog iona.

Linearna tiocijanatna skupina može biti prisutna u spojevima kao anion ili kao ligand, točnije kao monodentatni ligand koordiniran na sumpor ili dušik ili prenosni ligand. Ova skupina pojavljuje se u velikom broju koordinacijskih spojeva u tekućem i čvrstom stanju upravo zbog velike raznolikosti u načinu vezivanja i zbog velike koordinacijske sposobnosti same tiocijanatne skupine. Tiocijanatni ligand je linearan u većini kristalnih struktura i vezni kut S-C-N neznatno odstupa od 180°. Za aproksimativnu procjenu načina vezivanja tiocijanatnog liganda najčešće se koristi infracrvena spektroskopija, iako se najpouzdaniji podaci dobivaju analizom rendgenske difrakcije monokristala. Postoji jedanaest mogućih načina koordinacije tiocijanatnih liganda koji se dobivaju kombinacijom pet mogućih alternativa koje govore da tiocijanatni ligand može koordinirati jedan ili dva središnja atoma preko atoma dušika, te jedan, dva ili tri središnja atoma preko atoma sumpora. Dvanaestim mogućim načinom koordinacije ove skupine mogu se smatrati spojevi u kojima je tiocijanatna skupina prisutna kao anion.³⁹

Metalni tiocijanati su koordinacijski polimeri kod kojih su metalni centri premošteni raznim ambidentatnim tiocijanatnim ligandima.³¹ Svojstva vezivanja tiocijanatnog liganda mogu se procijeniti s kemijskog i kristalokemijskog stajališta.³⁹ Obzirom na različitu polarizabilnost atoma, tiocijanatni ligand koordiniran atomom sumpora je "meka", a onaj koordiniran atomom dušika "tvrda" baza, odnosno tiocijanatni ligand veže se s mekim mjestima

Lewisove kiseline koristeći S donor ili s tvrdim metalnim mjestima Lewisove kiseline koristeći N donor.^{31,39} Tiocijanat može koordinirati kao prenosni ligand u koordinacijskim polimerima ili kao terminalni ligand u molekularnim kompleksima.³¹

Tiocijanat se primjenjuje za dobivanje rijetkih i plemenitih zemnih metala u rudarskoj industriji i za detekciju specifičnih metalnih iona. Tiocijanatni kompleksi našli su široku primjenu i u optoelektroničkim uređajima, a bili su važni i u razvoju fotosenzibilnih solarnih ćelija.³¹ Metalni kompleksi koji sadrže tiocijanat, također se smatraju i najistraživanijim sustavima zbog svojih raznolikih struktura, primjene u magnetskim materijalima i svojstava luminiscencije. Tiocijanatni ion posjeduje polarizirajući π sustav, odnosno elektron je dislociran i može djelovati kao posrednik za magnetske interakcije između paramagnetskih središta prijelaznih metala.⁴⁰

Zbog dostupnosti tiocijanata kao reagensa i jednostavnosti tiocijanatnih metoda, tiocijanat je jedan od najvažnijih spektrofotometrijskih reagensa što je zaslužno za njegovu veliku popularnost u analitičkim laboratorijima. Najčešće se koristi za određivanje metala što se provodi u vodenom ili vodeno-acetonskom mediju ili nakon ekstrakcije otapalima koje sadrže kisik. Ekstraktibilnost metalnih kompleksa ovisi o kiselosti medija, koncentraciji tiocijanata i organskom otapalu. Stvaranjem tiocijanatnih kompleksa nastaju kationske, neutralne i anionske vrste. Tiocijanatni kompleksi također tvore ionske parove s organskim bazama kao što su tributilamin, diantipirilmetan i piridin koji se mogu ekstrahirati u kloroform i ostala inertna otapala. Neki tiocijanatni sustavi imaju nisku stabilnost boje, primjerice sustavi za željezom, što je povezano s redukcijskim svojstvima tiocijanata ili sa sporom polimerizacijom tiocijanske kiseline u kiselim otopinama, što uzrokuje žutilo. Intenzitet tiocijanatnih kompleksa u vodenim otopinama povećavaju otapala koja se miješaju s vodom.⁴¹ Iako su tiocijanatni ioni manje toksični od cijanida, oni su relativno stabilniji i stoga ih je prilično teško razgraditi, što za posljedicu ima štetne učinke na okoliš. Također, tiocijanati imaju i toksikokinetičko ponašanje i imaju učinak na citokrom oksidazu pri čemu uzrokuju staničnu hipoksiju i citotoksičnu anoksiju, što može uzrokovati smrt.³⁷

2.3. Utjecaj rodanida na okoliš

Iako tiocijanati nemaju direktan utjecaj na zdravlje živih bića, oni ipak imaju manju razinu toksičnosti koja se pojavljuje prilikom raspada tiocijanata u cijanid jer je tiocijanat nestabilniji od cijanida. Usprkos tome, moguće je trovanje tiocijanatom, a glavni simptomi koji se javljaju slični su trovanju cijanidom, primjerice neurološke, gastrointestinalne i

kardiovaskularne poteškoće kao što su tahikardija, delirij, laktanemija, arterijsko-venski problem prijenosa kisika i acidemija.⁴²

Otpadne vode onečišćene tiocijanatom spadaju u skupinu industrijskih otpadnih voda i široko su prisutne u tipičnim industrijama i djelatnostima kao što su tiskanje i bojanje tekstila, proizvodnja čelika, zlata, željeza i koksiranje. Tiocijanat uključuje ugljik, dušik, sumpor i druge elemente, a nastaje reakcijom sulfida, tiosulfata i cijanida. Tiocijanat je teško razgraditi jer ima veliku toksičnost i kemijsku stabilnost zbog čega uzrokuje veliku štetu u okolišu. Prosječan sadržaj tiocijanata u industrijskim otpadnim vodama je između 500 i 4000 mg/L,⁴³ a zbog recikliranja efluenta, koncentracija mu se stalno povećava što dodatno pridonosi poteškoćama pročišćavanja otpadnih voda, rezultirajući većim pritiskom na okoliš. Također, voda onečišćena tiocijanatom može prodrijeti u vodonosnike iz neobloženih ili strukturno oštećenih skladišnih objekata otpadnih voda i onečišćenih vodnih izvora. Niže koncentracije tiocijanata mogu izazvati trovanje kod viših organizama i lako izazvati sustavne bolesti kao oštećenje kože, probavnog sustava i živaca. Kada je tiocijanat prisutan u otpadnoj vodi u većoj mjeri, može inhibirati aktivnost anaerobne amonijeve oksidacije i tako smanjiti učinkovitost i učinak biološke obrade otpadnih voda. Trenutno nedostaje istraživanja o procesu razgradnje tiocijanata kod visoko opterećenih onečišćenih sustava i ne postoji statistički model za procjenu odnosa između njegove razgradnje i okoline u kojoj njegova količina raste.⁴³

Tiocijanati su dio industrijskog onečišćenja okoliša i kada dospiju u okoliš prodiru u usjeve kao što je manioka, kupus, repa, brokula, prokulice i cvjetača. Visoke koncentracije tiocijanata pronađene su u podzemnim vodama i sedimentu. Također, tiocijanat je poznat i kao kemikalija koja ometa normalan rad štitnjače jer inhibira unos jodida simporterom natrijeva jodida.⁴⁴

2.4. Načini uklanjanja rodanida iz okoliša

Prema istraživanju Yazici i sur.,⁴⁵ koji su proučavali uklanjanje tiocijanata iz vodenih otopina taloženjem u prisutnosti tiosulfata i iona bakra, pokazano je da su koncentracija tiosulfata i pH značajni parametri koji uglavnom pokreću taloženje SCN-a i da povećanje koncentracije tiosulfata nepovoljno utječe na uklanjanje tiosulfata. Nadalje, kisele i neutralne otopine pogoduju taloženju tiosulfata, a metoda nudi učinkovito rješenje za obradu otpadnih voda koje sadrže tiocijanat bez stvaranja nusproizvoda.⁴⁵

Postoji nekoliko fizikalnih i kemijskih procesa uklanjanja tiocijanata iz otpadnih voda, a to su adsorpcija na aktivni ugljen, surfaktantom modificirana srž kokosovog vlakna,

kalcinirani hidrotalcit, alkalno kloriranje, oksidacija željezom, ozonizacija, elektrosorpcija, separacija tekućinskim membranama. Za uklanjanje toksičnog učinka tiocijanata iz otpadnih voda mogu se primijeniti i biološki procesi, kao što je biorazgradnja, no takvi procesi zahtijevaju dugo vrijeme zadržavanja, velike kapacitete spremnika zbog velikih količina otpadne vode, a i mikroorganizmi su iznimno osjetljivi na čimbenike kao što su pH, temperatura i sadržaj čvrstih tvari.⁴⁶ Mikroorganizmi razgrađuju tiocijanat na autotrofni način za dobivanje energije, dok drugi mikroorganizmi koji razgrađuju tiocijanat koriste tiocijanat kao izvor ugljika ili dušika. Biološke procese moguće je provoditi u kombinaciji s kemijskim procesima za povećanje učinkovitosti.⁷ Tehnologija primjene kombinacije više bakterijskih kultura pokazuje pozitivne rezultate mikrobne razgradnje tiocijanata u prirodi. Naime, mikroorganizmi mogu lučiti razne razgradne enzime i izbjeći nepogodne učinke kao što su inhibicija supstrata, inhibicija produkta i niska učinkovitost koja se javlja kod pojedine bakterije tijekom samostalnog procesa razgradnje tiocijanata, a također kombiniraju i različite metaboličke puteve.⁴³ Jedan od dostupnih procesa je i proces ionske izmjene koji je jeftin, jednostavan za uporabu i prikladan za malu industrijsku uporabu. Dokazano je da je uklanjanje tiocijanata iz vodenih otopina pomoću anionsko izmjenjivačke smole vrlo učinkovito jer je smola vrlo učinkovit adsorbens za uklanjanje tiocijanata iz vodenih otopina.⁴⁶

Mnogo je istraženih načina uklanjanja tiocijanata odnosno obrade otpadnih tokova koji sadrže tiocijanate. Tako je primjerice ispitana biorazgradnja tiocijanata pomoću mješovite kulture *Ralstonia* sp. i *Klebsiella pneumoniae*, rezultati su pokazali stopu razgradnje tiocijanata od 500 mg/L/d za 2500 mg/L kao početno opterećenje tiocijanatom pri uvjetima obrade od pH 6,0 i temperaturi 37°C. Ovaj način razgradnje slijedio je put hidrolize tiocijanata. Drugi pristup temeljio se na korištenju željezom aktiviranog persulfata za uklanjanje tiocijanata. Pri sobnoj temperaturi, učinkovitost razgradnje bila je povećana u prisutnosti željeznih iona, a pri korištenju samog persulfata bila je zanemariva. Također, zabilježeno je da je 99% tiocijanata uklonjeno za 60 minuta pri optimalnom omjeru željezovih iona i persulfata. Drugim ispitivanjem utvrđeno je da je pri optimalnim uvjetima postignuto 90%-tno uklanjanje tiocijanata iz industrijske otpadne vode pomoću metode mikrovalne Fenton oksidacije. Uklanjanje tiocijanata prisutnog u otpadnim vodama rudnika zlata postignuto je sa 97%-tnom uspješnošću, koristeći kombinirani pristup koji uključuje ferate i biološku nitrifikaciju-denitrifikaciju pri optimalnim uvjetima. Iako je biološka obrada ekonomična i najpoželjnija metoda, primjena joj je ograničena na niske koncentracije onečišćujućih tvari i obrada je spora. U slučaju tiocijanata brza kinetika reakcije postignuta je klorom i ozonom kao kemijskim oksidansima, no glavni nedostatak je relativno veliko kapitalno ulaganje za proizvodnju ozona,

također korištenje ozona snažno je kontrolirano prijenosom mase plinovitog ozona u vodi, a i sam ozon je toksičan spoj. Slično ozonu, klor je također toksičan i stvara toksične kloro intermedijere kao što su klorirani izotiocijanati odnosno klorotiocijanati, tiocijanogeni, cijanogen kloridi i klorocijanogeni, a i sama obrada je sporija. Potrebno je razviti tehnologiju obrade koja rezultira maksimalnim uklanjanjem tiocijanata uz manju potrošnju energije, a sam proces trebao bi biti isplativa tehnologija. U povojima je novi pristup razgradnje kalijevog tiocijanata obradom hidrodinamičke kavitacije u kombinaciji s kemijskom oksidacijom.³⁷

2.5. Testovi ekotoksičnosti

Testovi ekotoksičnosti su testovi koji se provode za ispitivanje toksičnosti neke tvari koja je prisutna u okolišu. Oni se provode kako bi se otkrila koncentracija određene onečišćujuće tvari koja ima negativan, subletalni ili smrtonosan učinak na organizme.^{47,48} Općenito, ovakvi testovi koriste se za procjenu učinka nekog onečišćenja na rast, opstanak, ponašanje i reprodukciju ispitivanih organizama. Sve testove ekotoksičnosti potrebno je provoditi u skladu sa zakonskom regulativom.⁴⁸ Razlikujemo akutnu i kroničnu toksičnost, pri čemu se akutna toksičnost javlja neposredno nakon ili ubrzo nakon izlaganja toksičnoj tvari dok kronična toksičnost predstavlja negativan učinak koji se razvija tijekom dužeg vremenskog perioda koji može biti od nekoliko tjedana pa do nekoliko godina, upravo zbog te dugotrajne izloženosti onečišćujućoj tvari. Testovi ekotoksičnosti dijele se na *in vivo* i *in vitro* testove. *In vivo* testovi provode se kada se određuje utjecaj na organizam u cjelini i toksični učinci se ispituju na cijelom organizmu, dok se *in vitro* testovi provode kada se određuje utjecaj na određeni dio organizma i toksični učinci ispituju se na dijelu organizma ili stanici. Većina testova provodi se *in vitro*.^{49,50}

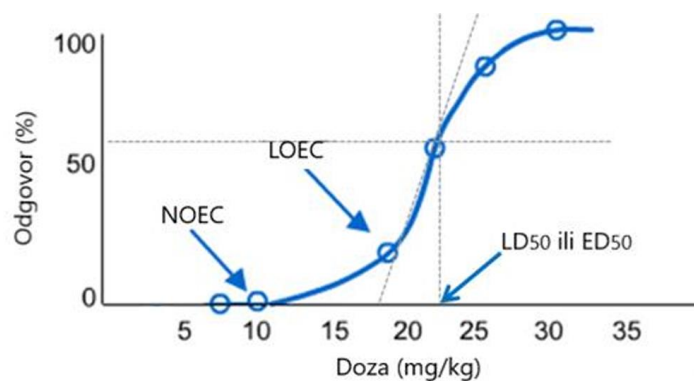
Kao što je ranije spomenuto svi ekotoksikološki testovi provode se u skladu sa zakonskim regulativama, a njih propisuju organizacije kao što su ISO i OECD. One propisuju metode provođenja testova ekotoksičnosti i dopušteno vrijeme izlaganja organizama ispitivanim tvarima.⁵¹ Razlog zbog kojeg su *in vitro* testovi više primijenjeni je u tome što su oni jeftiniji i brži, a također omogućuju brze, precizne i ponovljive rezultate, a tu su i etički razlozi ispitivanja negativnih učinaka na evolucijski razvijenijim kralježnjacima i propisi o zaštiti životinja. U svakom istraživanju ključna je ponovljivost postupka i da je taj proces kontroliran, a *in vitro* testovi nam upravo to omogućuju zbog čega su oni odgovarajući izbor za provođenje testova ekotoksičnosti.⁵² Ekotoksikološka istraživanja provode se na organizmima kao što su: račić *Daphnia magna* (slika 4), slatkovodni škampi, zebrafish (*Danio rerio*) (slika

4) te afričke kandaste žabe (*Xenopus leavis*). Pored navedenih organizama ekotoksikološka istraživanja se u velikoj mjeri provode i na mikroalgama upravo zbog činjenice da su one odgovorne za primarnu proizvodnju u vodenim ekosustavima gdje procesom fotosinteze prevode anorganski ugljik u organski, a služe i kao hrana mnogim vodenim organizmima pa zbog toga bilo kakva promjena na njima posljedično rezultira i promjenama u cijelom ekosustavu. Važnost praćenja promjena u vodenom ekosustavu je upravo u njegovoj povezanosti s ostalim ekosustavima, a zbog razvitka industrije, kako poljoprivredne tako i farmaceutske, kemijske i petrokemijske pa i komunalnih djelatnosti i ekoloških katastrofa, taj ekosustav biva pogođen tim djelatnostima što dovodi do onečišćenja istoga. U ekotoksikologiji se trenutno još uvijek koriste i kralježnjaci, uglavnom riblja jajašca, ali i njihova smrtnost kao krajnja točka procjene onečišćenja, odnosno toksičnosti kemikalije.^{50,53}



Slika 4. *Daphnia magna* pri povećanju 40x (lijevo)⁵⁴ i *Danio rerio* (desno)⁵⁵

Rezultati testa ekotoksičnosti prikazuju se i tumače krivuljom doza-odgovor. Uz pomoć navedene krivulje određuje se najniža doza ili koncentracija ispitivane tvari koja izaziva učinak, kao i najveća doza ili koncentracija bez vidljivog učinka. Najviša doza koja ne izaziva učinak naziva se NOEC, a najniža doza koja izaziva učinak naziva se LOEC.^{49,56-58} Najčešći cilj kod ispitivanja akutne ekotoksičnosti je određivanje LD₅₀ i ED₅₀, gdje vrijednost LD₅₀ označava dozu tvari koja je uzrokovala smrtnost kod 50% populacije izložene ispitivanoj tvari nakon određenog vremena trajanja testa, a ED₅₀ je efektivna doza onečišćujuće tvari koja uzrokuje negativan učinak kod 50% jedinki na kojima je provedeno ispitivanje.^{57,58} Krivulja doza-odgovor prikazana je na slici 5.



Slika 5. Krivulja doza-odgovor.⁵⁸

2.5.1. Test ekotoksičnosti s bakterijom *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida (slika 6) je bakterija, odnosno saprofitski pokretljivi bacil, koji je prirodno prisutan u vodi i tlu, to je Gram negativna, štapičasta, nefermentirajuća bakterija koja se često koristi u ekološkim studijama upravo zbog njene sposobnosti razgradnje mnogih aromatskih spojeva.^{59,60} Također je i striktni aerob zbog čega ne može preživjeti u uvjetima bez kisika te luči EPS (egzopolisaharidi) što pospješuje stvaranje pahuljica aktivnog mulja. Upravo zbog sposobnosti proizvodnje velikog broja ekstracelularnih enzima, primjerice lipaza, bakterije roda *Pseudomonas* prepoznate su kao pogodan organizam za primjenu u procesima biorazgradnje te imaju široku primjenu u bioremedijaciji zbog sposobnosti razgradnje različitih onečišćujućih tvari. Sposobnost proizvodnje enzima ove bakterije čini i pogodnima za korištenje u područjima onečišćenima teškim metalima jer primjerice pomoću enzima krom reduktaze uklanjaju krom. Bakterije roda *Pseudomonas* imaju i sposobnost razgradnje molekula alifatskih i aromatskih ugljikovodika te mogu metabolizirati molekule ksilena, toluena, fenola, naftalena, antracena, stirena, benzena, triklorbenzene, halogene fenole, klorkatehole, molekule 4-nitrofenola, azo bojila, antibiotik triklozan te specifične farmaceutike, zbog čega se koriste u bioremedijaciji za uklanjanje istih.⁶⁰⁻⁶⁴

One mogu podnijeti ekstremne uvjete kao što su niska temperatura i nedostatak hranjivih tvari, takvi uvjeti ne ometaju njihovu enzimsku aktivnost, a može se također koristiti i za bioremedijaciju izgorjelog tla. Imaju sposobnost razgradnje herbicida, a otporne su i na širok raspon antibiotika.⁶⁵ Enzim koji je u velikoj mjeri prisutan kod bakterija roda *Pseudomonas* je i esteraza koja kada je izolirana iz vrste *Pseudomonas putida* ima sposobnost katalizirati stereoselektivnu hidrolizu DL-MATI (metil DL-acetiltioisobutirat) koji se koristi za proizvodnju DAT kiseline (D-β-acetiltioisobutirična kiselina) visoke optičke gustoće. DAT

kiselina primjenjuje se u procesu sinteze kaptoprila za liječenje hipertenzije i kongestivnog zatajenja srca.^{66,67}



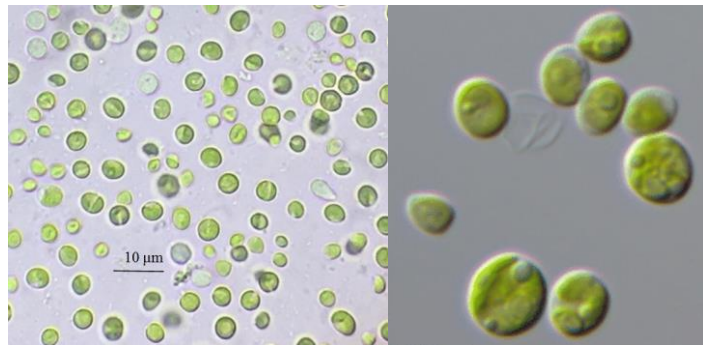
Slika 6. Mikrofotografija bakterijske kulture *Pseudomonas putida* snimljene elektronskim mikroskopom.⁶⁸

Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* specificirana je metoda za određivanje inhibicijskog utjecaja na Gram negativnu bakteriju *Pseudomonas putida* za uzorke površinskih, podzemnih i otpadnih voda. Ova metoda provodi se prema standardu ISO 10 712:1995 (Water quality-*Pseudomonas putida* inhibition test). Prilikom testa bakterijske stanice izložene su različitim razrjeđenjima ispitivane tvari usporedno s kontrolnim uzorkom koji ne sadrži ispitivanu tvar i na kraju izlaganja mjeri se rast bakterijskih stanica. Razlog korištenja bakterije *Pseudomonas putida* je što je ona reprezentativni organizam za heterotrofne organizme u površinskim vodama, a inhibicijski utjecaj na bakterijski rast mjeri se tijekom vremena od 16 ± 1 h, dok je optimalna temperatura za rast ove bakterije od 25 do 30 °C. Metoda je pogodna za istraživanje tvari topljivih u vodi, tla, komposta i otpada, ali nije pogodna za uzorke koji sadrže netopljive ili hlapljive materijale ili tvari koje reagiraju s hranjivim medijem te za jako obojane uzroke i uzorke koji podliježu promjeni tijekom provedbe testa (taloženje, biokemijska ili fotokemijska razgradnja) jer to može negativno djelovati na ponovljivost testa ili može ukazivati na lažne rezultate.⁶⁹

2.5.2. Test ekotoksičnosti s mikroalgom *Chlorella* sp.

Chlorella (slika 7) je rod kojem pripada oko trinaest vrsta jednostaničnih zelenih algi iz koljena *Chlorophyta*. Stanice su im sferičnog oblika bez bičeva, promjera od oko 2 do 10 μm .^{70,71} Kloroplasti im sadrže zelene fotosintetske pigmente klorofil a i b. U povoljnim uvjetima stanice se brzo umnožavaju nespolnim putem, a za reprodukciju su potrebni CO₂, voda, sunčeva

svjetlost i mala količina minerala.⁷⁰ Ove jednostanične alge česti su mikroorganizmi i prisutni su najviše u slatkoj vodi, ali i zraku i tlu. Njihove fiziološke i morfološke karakteristike mogu se mijenjati ovisno o okolišu, što otežava njihovu identifikaciju. Idealni su kandidati za ekotoksikološka istraživanja upravo zbog svojih fizioloških i biokemijskih svojstava i sposobnosti fotosinteze i redukcije nitrata. Primjenu nalaze također i u prehrambenoj industriji, biotehnologiji i agrikulturi.⁷² Novija istraživanja ispituju svojstva mikroalge *Chlorella* sp. u sintezi biodizela.⁷³



Slika 7. Prikaz mikroalge *Chlorella vulgaris* (lijevo)⁷⁴ i *Chlorella variabilis* (desno)⁷⁵

Bioaktivni spojevi su spojevi koji imaju biološku aktivnost i promiču dobro zdravlje, a njihovi učinci na organizam ovise o njihovim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima kao što su biorasploživost i kemijska struktura. Hrana koja je bogata bioaktivnim spojevima i koja se redovito konzumira, pozitivno utječe na ljudsko zdravlje zbog antioksidativnog djelovanja, a navedeno djelovanje smanjuje rizik od brojnih bolesti kao što su srčane bolesti, dijabetes, rak, katarakta i moždani udar. *Chlorella* je stoljećima primjenjivana kao dodatak prehrani i ima GRAS (eng. *Generally Recognized as Safe*) certifikat koji je izdala FDA (eng. *Food and Drug Administration*) što označava njezinu sigurnost za primjenu u ljudskoj prehrani podrazumijevajući uzgoj i proizvodnju uz odgovarajuću higijenu i dobar proces proizvodnje. *Chlorella* ima sposobnost proizvesti različite bioaktivne spojeve poput višestruko nezasićenih masnih kiselina, polisaharida, pigmenata i fenolnih spojeva.⁷¹ Prema eksperimentalnim studijama, *Chlorella* ima terapeutska svojstva kao što je primjerice antitumorski, antikoagulacijski, antibakterijski, antioksidativni, antihiperlipidemijski i imunomodulacijski učinak.^{71,76}

Svrha testa ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp. je utvrditi učinke potencijalno toksičnih tvari na rast jednostaničnih vrsta zelenih mikroalgi, a provodi se prema standardu OECD 201:1984 i smjernice su prilagodljive za uporabu s nekoliko vrsta

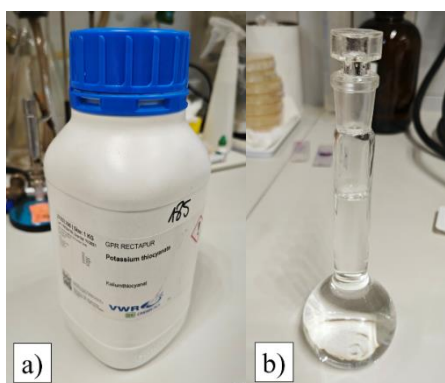
jednostaničnih algi. Princip metode temelji se na izlaganju eksponencijalno rastuće kulture odabranih zelenih mikroalgi različitim koncentracijama ispitivane tvari pri određenim uvjetima, a posljedična inhibicija rasta mikroalgi određuje se tijekom određenog vremena, kao što je praksa i u testovima s bakterijom *Pseudomonas putida*.⁶⁹ Za provođenje tih metoda važni su strogi uvjeti kao što su temperatura, pH, količina svjetlosti, količina hranjivih tvari i izbor medija. Ove metode temelje se na brojanju stanica mikroalgi tijekom izloženosti ekotoksičnoj tvari i na određivanju optičke gustoće bakterijske suspenzije.⁷⁷ CFU vrijednost za mikroalge *Chlorella* sp. određuje se brojanjem stanica unutar kvadrata neke od komorica uz svjetlosni mikroskop. Neke od takvih komorica su Buerkerova, Neubauerova, Buerker-Tuerkova, Fuchs-Rosenthalova, Malassezova i Nageotteova, ali jedna od češće korištenih je Thomina komorica, a svaku komoricu od one druge razlikuje broj kvadrata pomoću kojih se određuje ukupan broj stanica.⁷⁸ U testovima ekotoksičnosti otežano je detektiranje malih koncentracija onečišćujućih tvari zbog veće otpornosti mikroalge *Chlorella* sp.⁷⁹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Rodanidi

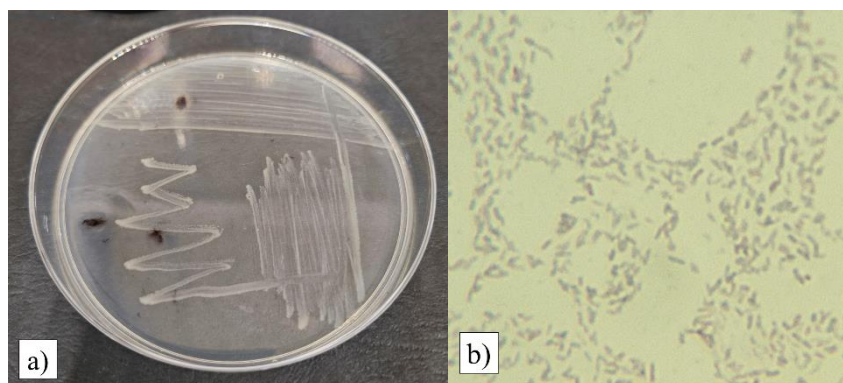
Za ispitivanje ekotoksičnosti primjenom različitih testnih organizama korišten je spoj rodanid, odnosno tiocijanat (slika 8). Proizveden je u SAD-u od strane tvrtke VWR Chemicals BDH®, a korišten je u obliku kristala kalijeve soli. Masena koncentracija temeljne otopine rodanida iznosila je $\gamma_R = 150 \text{ mg L}^{-1}$. Iz temeljne otopine pripremljene su otopine nižih koncentracija: $\gamma_{R1} = 1 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R2} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R3} = 25 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R4} = 50 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R5} = 75 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{R6} = 100 \text{ mg L}^{-1}$, koje su korištene za pokus ispitivanja ekotoksičnosti.



Slika 8. Prikaz pakiranja za a) kalijev tiocijanat iz koje je pripremljena temeljna otopina rodanida, te odmjerne tikvice u kojoj je priređena b) temeljna otopina rodanida.

3.1.2. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida*

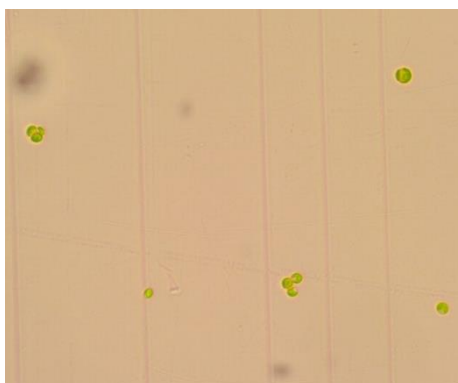
Ekotoksičnost različitih koncentracija rodanida određivala se primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas putida* (slika 9). Navedena Gram negativna bakterija pohranjena je u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.



Slika 9. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* izrasla na hranjivome agaru u Petrijevoj zdjelici pri 37 °C nakon 24 h dobivena tehnikom iscrpljivanja a), te b) mikrofotografija trajnog preparata kulture obojanog po Gramu mikroskopiran pri povećanju od 1000x.

3.1.3. Mikroalga *Chlorella* sp.

Ekotoksičnost različitih koncentracija rodanida određivala se primjenom mikroalge *Chlorella* sp. (slika 10) metodom izravnog određivanja ukupnog broja stanica mikroalgi brojanjem u Thominoj komorici i određivanjem inhibicije rasta stanica mikroalgi. Navedena kultura pohranjena je u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.



Slika 10. Mikrofotografija mikroalge *Chlorella* sp. snimljena u nultome danu pomoću svjetlosnog mikroskopa, P = 400x.

3.2. Mediji i kemikalije

3.2.1. Hranjivi agar

Za uzgoj bakterijske kulture pripravljeno je 500 mL hranjivog agara (HA) prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991). Podloga je pripravljena miješanjem 4 g hranjivog bujona i 9 g agara sa deioniziranom vodom. Potom je podloga homogenizirana i ostavljena 15 minuta da bubri. Nakon toga slijedi zagrijavanje podloge u zatvorenoj tikvici na plameniku uz tronožac i azbestnu mrežicu i uz konstantno miješanje. Zagrijana podloga izlije se u bočice koje se stavljaju na sterilizaciju u autoklav pri 1 atm, 121 °C tijekom 15 min.

3.2.2. Fiziološka otopina

Za pripremu decimalnih razrjeđenja, odnosno za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (eng. *Colony Forming Units*, CFU), korištena je 0,9 %-tna fiziološka otopina koja je pripravljena dodatkom 9 g NaCl-a u 1000 mL deionizirane vode. Prije uporabe pripravljena otopina sterilizirana je vlažnom sterilizacijom u autoklavu.

3.2.3. Mineralni medij

Za pripremu otopine rodanida i osiguravanje minimalnih uvjeta za rast bakterija tijekom pokusa pripravljeno je 500 mL mineralnog medija (MM). pH-vrijednost podešena je na 7,0, a podešavala se pomoću 1 M NaOH i 1 M HCl. Pripremljeni MM steriliziran je u autoklavu prije uporabe. MM pripravljen je prema literaturi, a sastav medija (za 1 L) koji se koristi za provedbu testa prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Sastav medija (za 1 L) za provedbu ispitivanja toksičnosti tvari primjenom *P. putide*.

Tvar	m / mg
NaNO ₃	500
K ₂ HPO ₄	120
KH ₂ PO ₄	60
MgSO ₄ ×7H ₂ O	200
željezov(III) citrat	0,5

3.2.4. Bazalni medij

Kao medij za postavljanje pokusa, odnosno pripreme otopine rodanida i uzgoj mikroalge *Chlorella* sp., koristio se bazalni medij (BM), *Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution* (Sigma-Aldrich, SAD). Medij je pripremljen prema uputama proizvođača pri čemu se 20 mL BM-a dodaje na 1 L deionizirane vode, a njegov sastav dan je u tablici 2. Za potrebe pokusa pripremljeno je 500 mL BM-a. pH-vrijednost BM-a podešena je na 8,0 pomoću 1 M NaOH i 1 M HCl. Prije uporabe BM je steriliziran u autoklavu.

Tablica 2. Sastav medija za uzgoj mikroalgi (po 1 L).

Tvar	<i>m</i> / mg
NH ₄ Cl	15
MgCl ₂ ×6H ₂ O	12
CaCl ₂ ×2H ₂ O	18
MgSO ₄ ×7H ₂ O	15
KH ₂ PO ₄	1,6
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,08
Na ₂ EDTA×2H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,185
MnCl ₂ ×4H ₂ O	0,415
ZnCl ₂	3×10 ⁻³
CoCl ₂ ×6H ₂ O	1,5×10 ⁻³
CuCl ₂ ×2H ₂ O	10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	7×10 ⁻³
NaHCO ₃	50

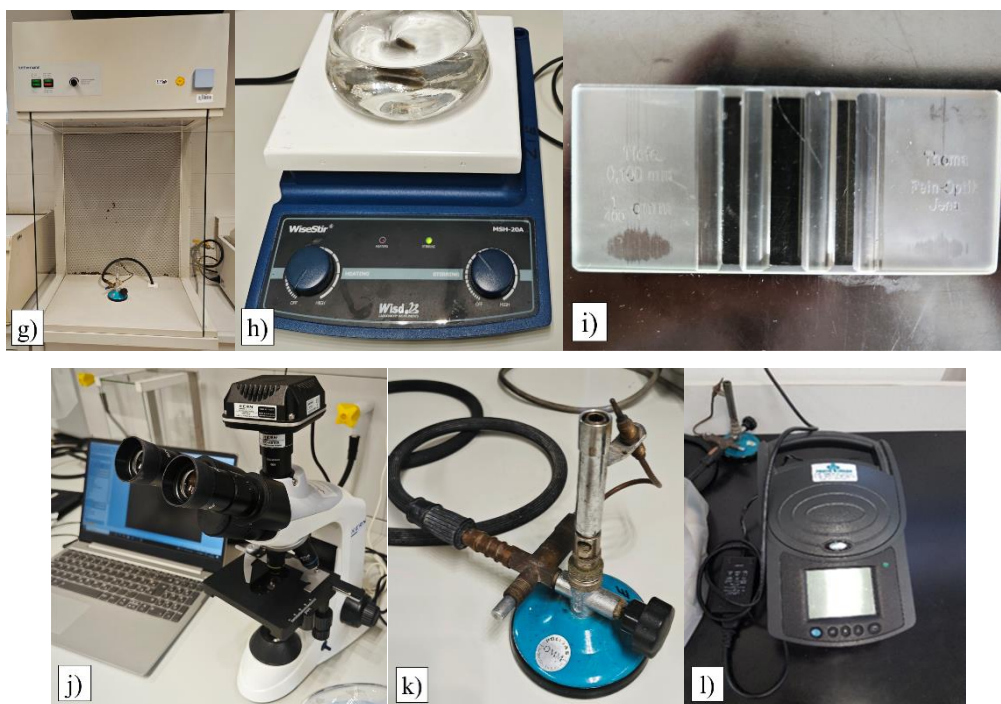
3.3. Mjerni instrumenti i oprema

Mjerni instrumenti i oprema korišteni tijekom provođenja eksperimenta (slika 11):

- standardno stakleno laboratorijsko posuđe za pripremu otopina, čuvanje otopina, mjerenje i slično
- rotacijska tresilica (SIA BIOSAN PSU-10i Orbital Shaker, Latvia) za kontinuiranu homogenizaciju uzoraka

- vaga na četiri decimale (KERN ALJ 220-4NM) za vaganje soli za pripremu otopina
- homogenizator za pripremu decimalnih razrjeđenja
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija) za sterilizaciju MM-a, BM-a, hranjive podloge, fiziološke otopine i staklenog posuđa korištenog tijekom eksperimenta
- termostat (Termomedicinski aparati, Hrvatska) za uzgoj bakterija pri 37 °C
- pH elektroda (SenTix® 940) i prijenosni mjerač (WTW Multi 340i) za određivanje pH vrijednosti, instrument je kalibriran prije svake uporabe
- spektrofotometar (Hach, Model DR/2400, SAD) za određivanje optičke gustoće
- magnetska miješalica (WiseStir MSH – 20A) za podešavanje pH vrijednosti MM-a i BM-a
- Thomina komorica za određivanje broja živih stanica algi (CFU)
- aeracijska pumpa za aeriranje alge *Chlorella* sp. tijekom preduzgoja
- svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) za mikroskopiranje mikroalge *Chlorella* sp. i trajnog preparata bakterije *Pseudomonas putida*
- plamenik za sterilnu tehniku rada
- mikrobiološke eze
- laminar komora za sterilnu tehniku rada
- automatska pipeta za pripremu decimalnih razrjeđenja
- vodena kupelj za hranjivu podlogu





Slika 11. Mjerni instrumenti i oprema: a) rotacijska tresilica, b) vaga, c) homogenizator, d) autoklav, e) termostat, f) pH elektroda i prijenosni mjerač, g) laminar komora, h) magnetska miješalica, i) Thomina komorica, j) svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom, k) plamenik, l) spektrofotometar.

3.4. Metode rada

3.4.1. Priprema otopina rodanida

Temeljne otopine rodanida pripremljene su otapanjem određene mase čvrste soli kalijeva tiocijanata u 100 mL mineralnog medija (za test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*), odnosno u 100 mL bazalnog medija (za test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.). Masena koncentracija pripremljenih temeljnih otopina rodanida iznosila je 150 mg L⁻¹.

3.4.2. Uzgoj bakterije *Pseudomonas putida*

Za potrebe eksperimenta pripremljena je 24-satna kultura bakterije *Pseudomonas putida* uzgojena na HA pri 37 °C, nakon toga navedena kultura se izuzimala za pripremu suspenzije. U mineralnom mediju pripremljena je suspenzija koja je postavljena na tresilicu tijekom 24 h pri sobnoj temperaturi. Svrha preduzgoja je ubrzati fazu prilagodbe mikroorganizama za

vrijeme izvođenja samog eksperimenta. Suspenzija se razrjeđivala kako bi se postigla željena optička gustoća od približno 0,2. Optička gustoća mjerena je pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od $\lambda = 436 \text{ nm}$.

3.4.3. Uzgoj mikroalge *Chlorella* sp.

Za potrebe eksperimenta, dva tjedna prije postavljanja pokusa, pripremljena je kultura mikroalge *Chlorella* sp. Kultura je uzgojena u sterilnim uvjetima kao suspenzija mikroalgi u bazalnom mediju uz konstantnu aeraciju pri sobnim uvjetima (slika 12). Kako je svjetlost potrebna za njen uzgoj, omogućena je pravilna izmjena svjetlosti i tame (16 h svjetlost i 8 h tama). Svrha preduzgoja je ubrzati fazu prilagodbe mikroorganizama za vrijeme izvođenja samog eksperimenta. Suspenzija se razrjeđivala kako bi se postigla željena optička gustoća od približno 0,02. Optička gustoća mjerena je pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od $\lambda = 670 \text{ nm}$. Broj ukupnih stanica mikroalgi određivao se pomoću Thomine komorice i svjetlosnog mikroskopa (slika 13).



Slika 12. Preduzgoj mikroalge *Chlorella* sp.



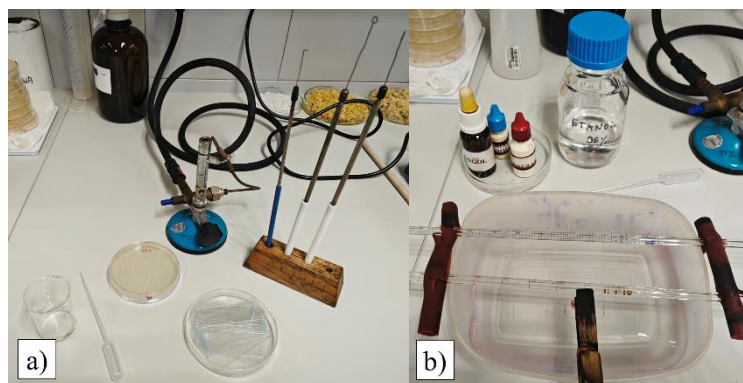
Slika 13. Mikrofotografija mikroalge *Chlorella* sp. vidljive unutar jednog velikog kvadrata Thomine komorice pri povećanju od $P = 400x$.

3.4.4. Sterilna tehnika rada

Prilikom sterilne tehnike rada na radnoj plohi nalazi se upaljeni plamenik, plamen je plavi i šušteći. Radna ploha temeljito se prebriše otopinom izosana i vaticom. Mikrobiološke eze steriliziraju se u plamenu u nakošenom položaju do užarenja ušice. Sav rad provodi se u neposrednoj blizini plamenika.

3.4.5. Priprema trajnog preparata

Prilikom pripreme trajnog preparata radi se sterilnom tehnikom rada (slika 14a). Na sredinu predmetnice nanese se kap vode. Zatim se pomoću ušice sterilne mikrobiološke eze izuzme bakterijska kultura i postavi u kapljicu vode nanесenu na predmetnicu. Nakon toga se pomoću mikrobiološke eze, na sredini predmetnice, razvlačenjem od ruba do ruba nanese bakterijska suspenzija i predmetnica se ostavi u blizini plamenika kako bi se osušila. Kada se predmetnica osušila, 2-3 puta se donja strana predmetnice, na kojoj se ne nalazi kultura, provuče preko plamena kako bi se preparat fiksirao. Tako se pripremljeni preparat boja prema postupku prikazanom u tablici 3 (slika 14b). Obojani i osušeni preparat mikroskopira se svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od $P = 1000x$.



Slika 14. Prikaz: a) postupka pripreme trajnog preparata, b) postupka bojanja trajnog preparata po Gramu.

Tablica 3. Prikaz postupka bojanja trajnog preparata bakterije po Gramu.

Postupak i otopine	Vrijeme djelovanja	Gram (+) bakterije	Gram (-) bakterije
kristal violet	3 min	Modre	modre
odliti boju i preliti lugolom (I + KI)	3 min	ostaju modre	ostaju modre
odliti otopinu lugola i isprati s 95%-tnim etanolom	30 s	ostaju modre	bezbojne
isprati vodom	-	-	-
naknadno bojanje otopinom safranina	1 min	Modre	crvene
isprati vodom, osušiti čistom staničevinom	-	-	-

3.4.6. Određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

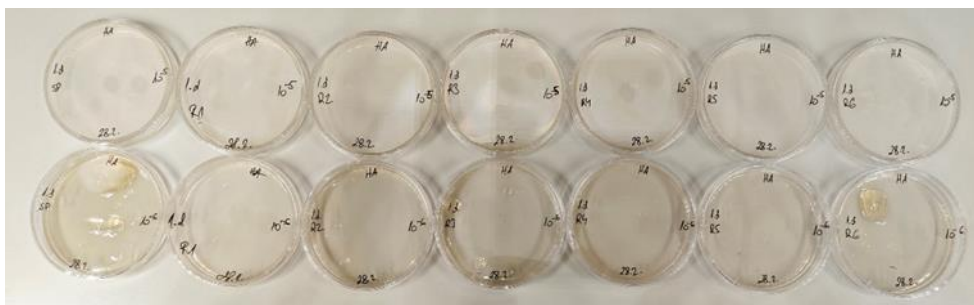
Pokus ispitivanja ekotoksikološkog djelovanja rodanida primjenom bakterije *Pseudomonas putida* provodio se u tikvicama od 100 mL. Pripremljeno je sedam uzoraka (slijepa proba i šest različitih koncentracija rodanida). U svaku tikvicu dodan je određeni volumen otopine rodanida, suspenzije mikroorganizama i mineralnog medija, osim u slijepu probu gdje je dodan samo određeni volumen suspenzije mikroorganizama i mineralnog medija. Radni volumen bio je 25 mL. Uzorci su kontinuirano homogenizirani na rotacijskoj tresilici pri sobnoj temperaturi i 160 okretaja u minuti tijekom 3 dana.

Test ekotoksičnosti primjenom Gram-negativne bakterije *Pseudomonas putida* temeljio se na određivanju inhibicijskog utjecaja ispitivane tvari mjerenjem rasta bakterije prema standardu ISO 10 712:1995. Određivanje se provodi mjerenjem rasta bakterijskih stanica prilikom izloženosti različitim razrjeđenjima ispitivane tvari te usporedno s kontrolnim uzorkom koji ne sadrži ispitivanu tvar (slijepa proba). Prije početka izvođenja testa, određeni su početni uvjeti pokusa prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Početni uvjeti testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

OG _{0sr.}	CFU ₀ / st/mL	logCFU ₀ / -	pH-vrijednost ₀ / -	T / °C
0,21	7,8×10 ⁶	6,89	7,02	23,4

Mjerenja provođena na uzorcima čija je priprema opisana u poglavlju 3.4.5., provodila su se svaka 24 sata tijekom 3 dana. Svakih 24 sata izuzimalo se 0,1 mL suspenzije iz Erlenmeyerovih tikvica s uzorcima te se taj volumen dodao u epruvetu s 9,9 mL sterilne fiziološke otopine. Nakon homogenizacije, 0,1 mL uzorka izuzeo se iz prethodne epruvete te dodao u novu epruvetu s 9,9 mL sterilne fiziološke otopine. U sljedećem koraku iz prethodne epruvete izuzet je 1 mL uzorka i dodan u novu epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Taj postupak ponovljen je još jednom. Time su dobivena razrjeđenja 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵ i 10⁻⁶. Nakon pripremljenih razrjeđenja iz epruveta s razrjeđenjima 10⁻⁵ i 10⁻⁶ izuzet je po 1 mL suspenzije i otpipetiran u Petrijeve zdjelice sterilnom tehnikom rada. Uzorci su potom zaliveni hranjivom podlogom te homogenizirani su pomicanjem zdjelica u obliku broja osam 8-10 puta (slika 15). Petrijeve zdjelice su potom postavljene u termostat na inkubaciju tijekom 24-48 h na 37 °C. Ovaj postupak ponovljen je još dva puta za drugi i treći dan provođenja eksperimenta. Nakon uzgoja bakterija, na hranjivoj podlozi izrasle su vidljive bakterijske kolonije koje su potom izbrojane.



Slika 15. Petrijeve zdjelice s uzorkom i podlogom prije inkubacije u termostatu pri 37 °C tijekom 24-48 h.

Razrjeđenja onih Petrijevih zdjelica koje sadrže 30 do 300 kolonija koriste se za određivanje CFU (eng. *Colony Forming Units*) vrijednosti pomoću jednadžbe (1):

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad (1)$$

Na temelju rezultata izračunatih pomoću prethodne jednadžbe dobiven je graf ovisnosti logaritamske vrijednosti CFU o vremenu u satima. Pomoću vrijednosti CFU izračunata je inhibicija rasta bakterije koja se računa prema jednadžbi (2):

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

gdje je $CFU_{kontrola}$ vrijednost ukupnog broja živih stanica bakterija u kontrolnoj tikvici, a CFU_{uzorak} vrijednost ukupnog broja živih stanica bakterija u uzorku. Na temelju tog izračuna dobiven je graf ovisnosti inhibicije o koncentraciji rodanida u uzorcima za sva tri dana provođenja testa.

3.4.7. Određivanje ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Pokus ispitivanja ekotoksikološkog djelovanja rodanida na mikroalgu *Chlorella* sp. provodio se u tikvicama od 100 mL. Pripremljeno je sedam uzoraka (slijepa proba i šest različitih koncentracija rodanida) (slika 16). U svaku tikvicu dodan je određeni volumen otopine rodanida, suspenzije mikroorganizama i bazalnog medija, osim u slijepu probu gdje je dodan samo određeni volumen suspenzije mikroorganizama i bazalnog medija. Radni volumen bio je 50 mL. Tijekom 3 dana pri sobnoj temperaturi te 160 okretaja u minuti uzorci su homogenizirani na rotacijskoj tresilici.



Slika 16. Pokus ispitivanja ekotoksikološkog djelovanja rodanida na mikroalgu *Chlorella* sp.

Ispitivanje toksičnosti primjenom mikroalgi temelji se na mjerenju inhibicije njihova rasta prema normi OECD 201:1984. Princip ove metode temelji se na izlaganju eksponencijalno rastuće kulture zelene mikroalge *Chlorella* sp. različitim koncentracijama ispitivane tvari, u ovom slučaju to su rodanidi. Inhibicija rasta mikroalgi određuje se tijekom određenog

vremenskog razdoblja, u ovom slučaju 3 dana. Prije provođenja testova izmjerena je pH-vrijednost medija i optička gustoća. Početni uvjeti prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Početni uvjeti testa ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

OG _{0sr.}	CFU ₀ / st/mL	logCFU ₀ / -	pH-vrijednost ₀ / -	T / °C
0,02	3,7×10 ⁵	5,57	7,76	24,0

Mjerenja provedena na uzorcima čija je priprema opisana u poglavlju 3.4.5., provodila su se svaka 24 sata tijekom 3 dana. Broj ukupnih stanica mikroalgi određivao se pomoću Thomine komorice i svjetlosnog mikroskopa. Iz svakog uzorka izuzeta je kap suspenzije algi i postavljena na Thominu komoricu koja je zatim prekrivena pokrivnim stakalcem i mikroskopirana. CFU se određuje brojanjem stanica mikroalgi na tri nasumično odabrana, ali uzastopna velika kvadrata vidljiva na Thominoj komorici pri povećanju P = 400x. Nadalje, CFU vrijednost računa se prema jednadžbi (3):

$$N = \frac{m \times n \times 16 \times 10^4}{K} \quad (3)$$

gdje je N (ili CFU) ukupan broj stanica mikroalgi u 1 mL suspenzije, m ukupan broj pobrojanih stanica, n razrjeđenje koje iznosi 10⁰ odnosno 1, 16 ukupan broj velikih kvadrata vidljivih na Thominoj komorici, 10⁴ korekcija volumena, a K broj velikih kvadrata u kojima je izvršeno brojanje. Nadalje, određene su vrijednosti CFU koje su korištene za grafički prikaz ovisnosti logCFU o vremenu u satima te računanje inhibicije prema jednadžbi (4):

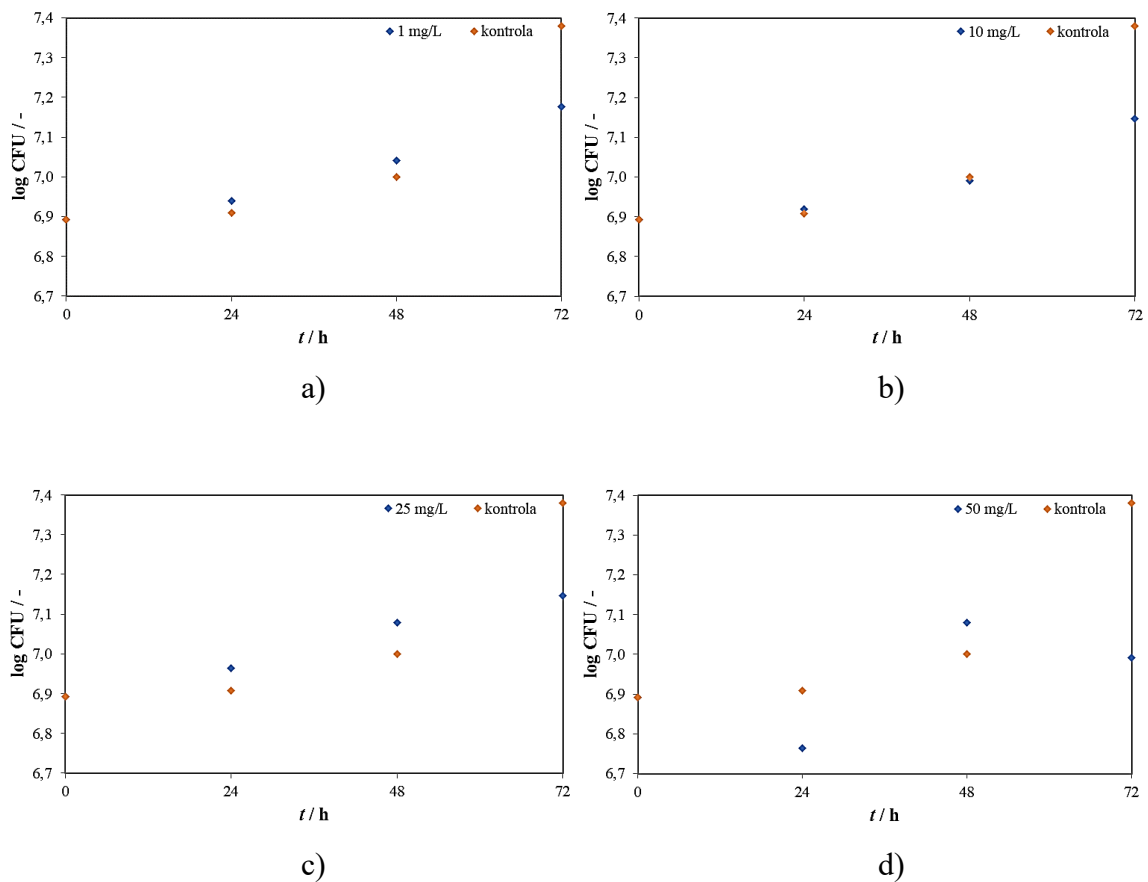
$$INH = \frac{CFU_{kontrola} - CFU_{uzorak}}{CFU_{kontrola}} \times 100 \quad (4)$$

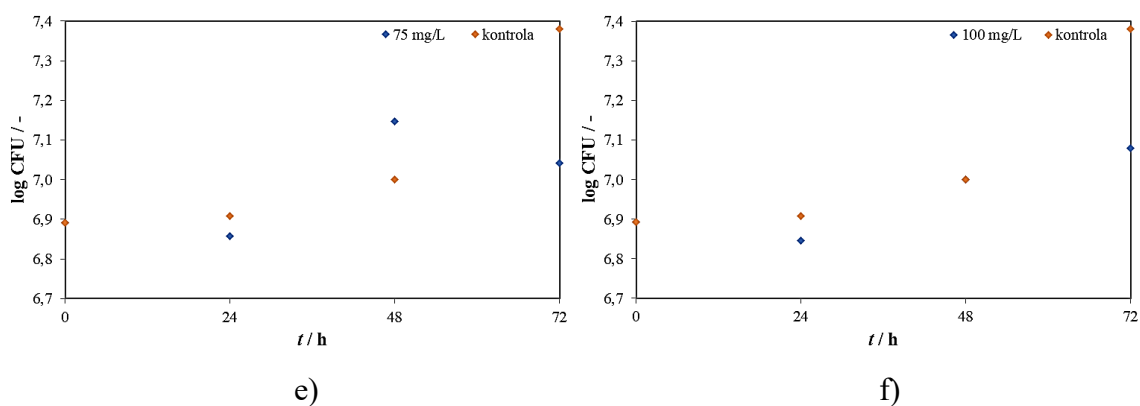
Rezultati testa uspoređeni su sa kontrolnim uzorcima koji nisu sadržavali rodanide. Pomoću dobivenih vrijednosti dobiveni su grafovi ovisnosti inhibicije o koncentracijama rodanida („S^c krivulje).

4. REZULTATI

4.1. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

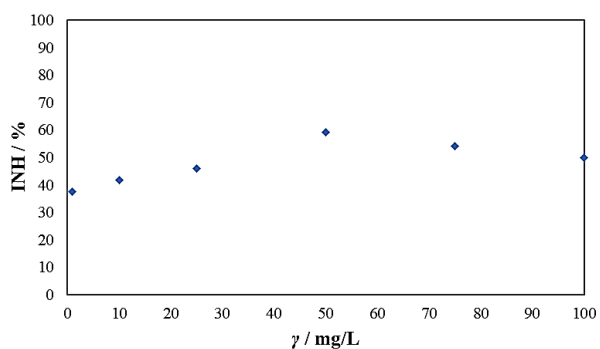
Tijekom provedbe testa ekotoksičnosti bakterijom *Pseudomonas putida* pratio se broj izraslih bakterijskih kultura na hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama, a brojanjem nastalih kolonija određene su CFU vrijednosti kontrolnog uzorka te uzoraka s otopinama rodanida za svaki od tri dana provođenja testa. Pomoću vrijednosti CFU izračunate su vrijednosti logCFU za pojedine koncentracije rodanida tijekom tri dana mjerenja. Dobivene vrijednosti uspoređene su sa vrijednostima kontrolnog uzorka, što je vidljivo na sljedećim grafovima (slika 17).



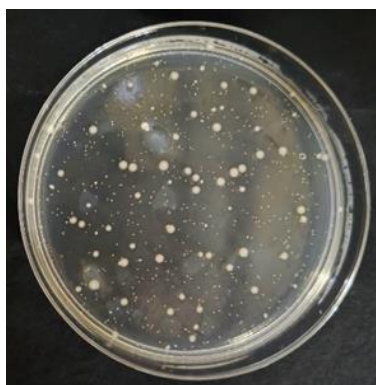


Slika 17. Grafički prikazi promjene logCFU kontrolnog uzorka i uzorka s otopinama rodanida od a) $\gamma_{R1} = 1 \text{ mg L}^{-1}$, b) $\gamma_{R2} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, c) $\gamma_{R3} = 25 \text{ mg L}^{-1}$, d) $\gamma_{R4} = 50 \text{ mg L}^{-1}$, e) $\gamma_{R5} = 75 \text{ mg L}^{-1}$, f) $\gamma_{R6} = 100 \text{ mg L}^{-1}$, tijekom tri dana provedbe testa ekotoksičnosti.

Pomoću vrijednosti CFU izračunate su i vrijednosti inhibicije te je prikazan graf ovisnosti inhibicije o koncentraciji rodanida (slika 18).



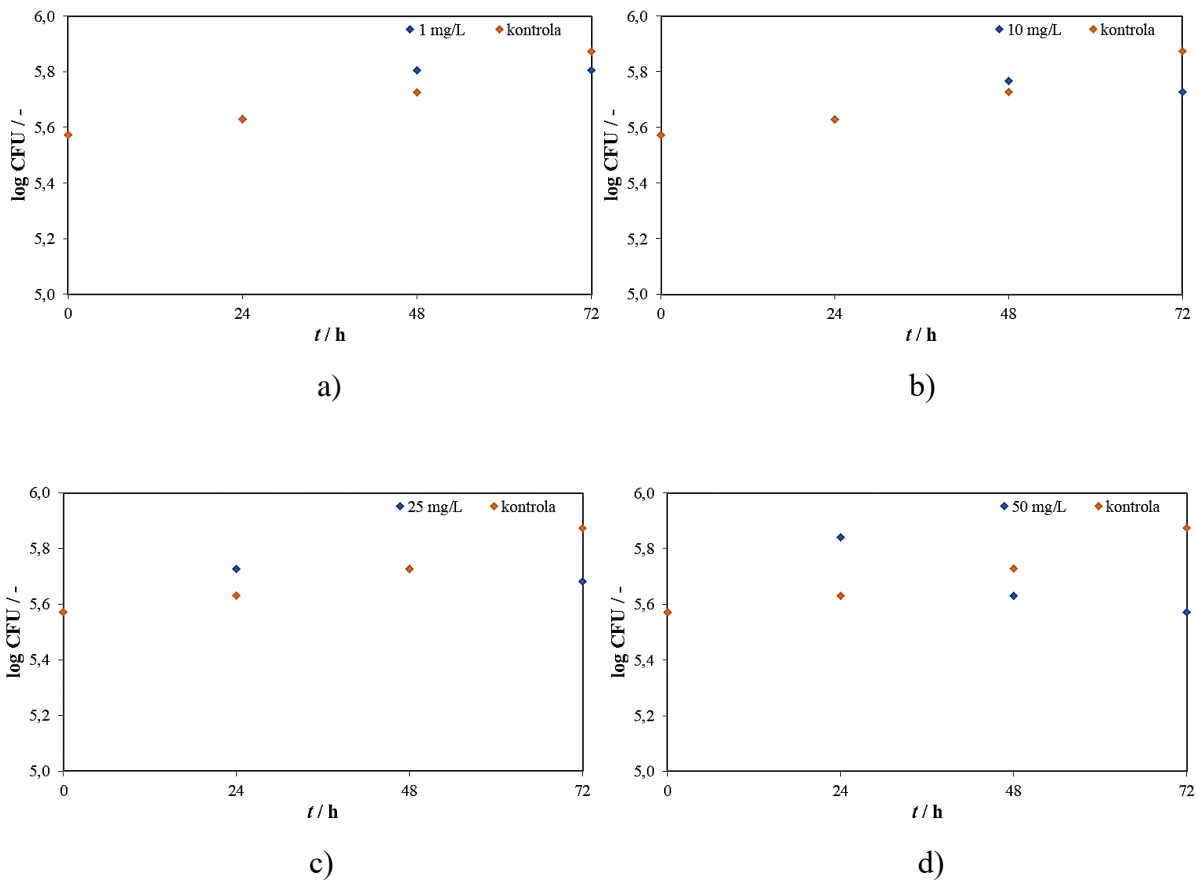
Slika 18. Doza-odgovor krivulja za rodanide dobivena provedbom testova ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

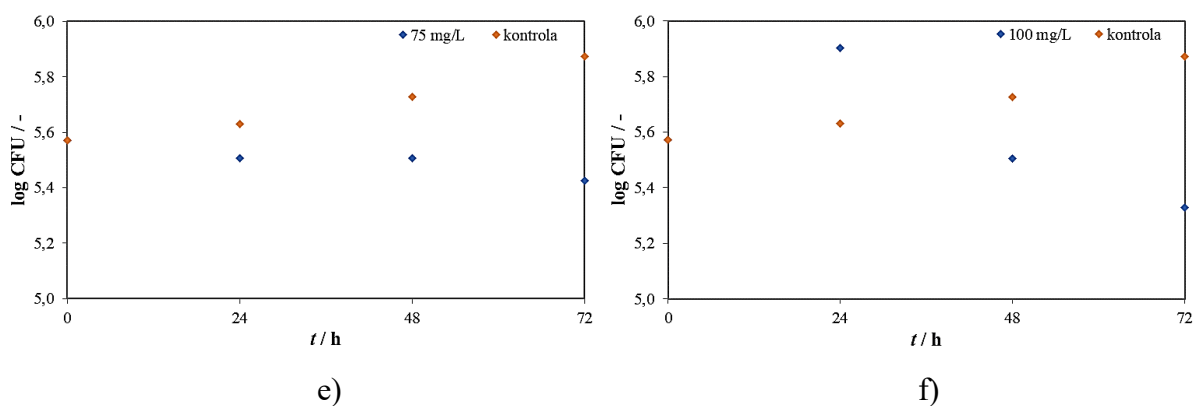


Slika 19. Prikaz izraslih kolonija bakterije *Pseudomonas putida* nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24-48 h za razrjeđenje 10^{-5} .

4.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

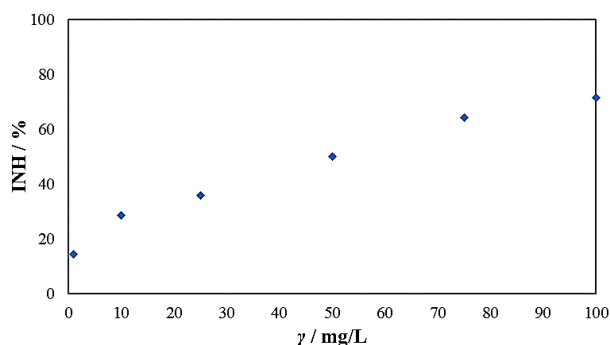
Test ekotoksičnosti pomoću mikroalge *Chlorella* sp. proveden je brojanjem stanica mikroalgi pomoću Thomine komorice i svjetlosnog mikroskopa te su određene vrijednosti CFU kontrolnog uzorka te uzorka s otopinama rodanida za svaki od tri dana provođenja testa. Pomoću vrijednosti CFU izračunate su vrijednosti logCFU za pojedine koncentracije rodanida tijekom tri dana mjerenja. Dobivene vrijednosti uspoređene su sa vrijednostima kontrolnog uzorka, što je vidljivo na sljedećim grafovima (slika 20).





Slika 20. Grafički prikazi promjene logCFU kontrolnog uzorka i uzorka s otopinama rodanida od a) $\gamma_{R1} = 1 \text{ mg L}^{-1}$, b) $\gamma_{R2} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, c) $\gamma_{R3} = 25 \text{ mg L}^{-1}$, d) $\gamma_{R4} = 50 \text{ mg L}^{-1}$, e) $\gamma_{R5} = 75 \text{ mg L}^{-1}$, f) $\gamma_{R6} = 100 \text{ mg L}^{-1}$, tijekom tri dana provedbe testa ekotoksičnosti.

Pomoću vrijednosti CFU izračunate su i vrijednosti inhibicije te je prikazan graf ovisnosti inhibicije o koncentraciji rodanida (slika 21).



Slika 21. Doza-odgovor krivulja za rodamide dobivena provedbom testova ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Vrijednosti EC_{50} i EC_{20} procijenjene su grafički iz jednadžbe pravca dobivenog linearizacijom vrijednosti inhibicije i koncentracije rodanida. Njihove vrijednosti prikazane su u tablici 6

Tablica 6. Procijenjene vrijednosti EC za provedene testove ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp. za uzorak rodanida.

Testni organizam	EC_{20} / mg/L	EC_{50} / mg/L
<i>Pseudomonas putida</i>	/	49,03
<i>Chlorella</i> sp.	3,08	36,23

5. RASPRAVA

Ljudska aktivnost je kroz razvoj različitih grana industrije uzrokovala mnoge negativne i nepovratne posljedice na sve dijelove biosfere.⁸⁰ Usprkos tome, razvila se i svijest o ekološkim problemima i važnošću njihova rješavanja. Kao posljedica toga, pojavljuje se zelena kemija koja objašnjava važnost primjene i proizvodnje kemikalija manje štetnih za okoliš, kao i njihovog zbrinjavanja.⁸¹ Važno je pažljivo i pravilno rukovati tvarima koje mogu ugroziti i onečistiti okoliš, a ako dospiju u okoliš potrebno ih je ukloniti na siguran način kako se pri tom postupku ne bi dodatno onečistio okoliš.⁸²

Primjer takvih kemikalija su i rodanidi. To su spojevi koji se koriste u raznim industrijskim primjenama, uključujući kao reagense u kemijskoj sintezi, u fotografiji i u proizvodnji određenih gnojiva i boja. Kako su u širokoj uporabi, posljedično imaju i značajan utjecaj na okoliš. Pa tako rodanidi pokazuju značajnu toksičnost za organizme u tlu, a posebno utječu na preživljavanje gujavica i mikrobnu aktivnost. Primjetan je i utjecaj na ciklus dušika i aktivnost enzima u tlu, što ukazuje na mogućnost negativnog utjecaja na ekološke procese u tlu.⁸³ Pokazalo se da tiocijanati smanjuju mikrobnu biomasu i mogu promijeniti strukturu mikrobne zajednice pri čemu smanjuju bioraznolikost i ometaju mikrobne interakcije ključne za zdravlje tla. Također smanjuju i enzimsku aktivnost i mogu inhibirati ključne enzime u tlu koji su uključeni u kruženje hranjivih tvari u tlu i razgradnju organske tvari, odnosno ciklus ugljika i dušika, čime utječu na biokemijske procese u tlu. Navedeno može narušiti plodnost tla i njegovu sposobnost podržavanja rasta biljaka, odnosno zadaće ekosustava općenito.^{83,84} Razna regulatorna tijela, uključujući Europsku uniju i Agenciju za zaštitu okoliša SAD-a (EPA), uspostavila su smjernice i propise za ograničavanje izloženosti ljudi i ispuštanja tiocijanata u okoliš. Ovi propisi uspostavljeni su kako bi se ublažili njihovi štetni učinci na ekosustave i ljudsko zdravlje.⁸⁵

U ovom radu ispitan je utjecaj rodanida na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp., odnosno na njihovu sposobnost razvoja u prisutnosti rodanida. U tu svrhu određen je broj stanica bakterija i mikroalgi nakon 24, 48 i 72 sata izlaganja onečišćujućoj stari. Određena je i inhibicija, a procijenjene su i vrijednosti EC₅₀ i EC₂₀.

5.1. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Ovisnost promjene logCFU vrijednosti o vremenu korištena je za izražavanje inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida*. Na slici 17 prikazani su grafički prikazi ovisnosti logCFU o

vremenu za određene koncentracije rodanida. Jedino je kod koncentracije rodanida od 100 mg L⁻¹ primjetno smanjenje broja kolonija uzrokovano ekotoksičnošću, odnosno u drugom danu je broj kolonija jednak kontroli. Kod ostalih koncentracija od 1 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ i 75 mg L⁻¹ brojevi kolonija variraju u odnosu na kontrolni uzorak. Te varijacije posljedica su raznih eksperimentalnih uvjeta i objašnjavaju se nepredvidivošću efekta hormoneze i vidljivo je da se on kod koncentracija od 50 mg L⁻¹ i 75 mg L⁻¹ pojavljuje u drugom danu testa, dok kod svih testova u trećem danu potpuno nestaje.⁸⁶ Kod koncentracije od 10 mg L⁻¹ hormoneza je vidljiva u prvom danu, dok se kod koncentracija od 1 mg L⁻¹ i 25 mg L⁻¹ hormoneza primjećuje i u prvom i u drugom danu.

Pomoću dobivenih vrijednosti logCFU izračunate su vrijednosti inhibicije i prikazane su grafički u ovisnosti o koncentracijama rodanida, što je vidljivo na slici 18. Krivulja postepeno raste i dostiže maksimum pri koncentraciji od 50 mg L⁻¹, nakon čega krivulja neznatno opada i možemo reći da stagnira što nam govori da je pri koncentraciji od 50 mg L⁻¹ dosegnuta maksimalna inhibicija i daljnjim povećanjem koncentracije inhibicija ne raste. Ovakva krivulja moguća je posljedica i eksperimentalne pogreške tijekom ispitivanja. Zbog prethodno navedenih mogućih objašnjenja potrebno je ponoviti mjerenja kako bi se provjerila točnost rezultata. Najveća vrijednost inhibicije koja je vidljiva kod koncentracije od 50 mg L⁻¹ iznosi 59,17 % i na temelju tako dobivenih rezultata može se pretpostaviti da rodanidi pokazuju značajniji ekotoksični utjecaj prema bakterijskoj kulturi *Pseudomonas putida*.

5.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Vrijednosti logCFU izračunate su pomoću CFU vrijednosti koje su dobivene određivanjem pomoću svjetlosnog mikroskopa uz upotrebu Thomine komorice. Kao što je to slučaj kod bakterije *Pseudomonas putida*, kod mikroalge *Chlorella* sp. također su primijećene varijacije broja kolonija u odnosu na kontrolu što se može objasniti efektom hormoneze.⁸⁶ Kod svih koncentracija rodanida primjećuje se da se broj kolonija smanjuje tijekom tri dana provođenja ispitivanja, dok broj kolonija u kontrolnom uzorku raste. Kod koncentracija od 1 mg L⁻¹ i 10 mg L⁻¹ vidljivo je da se efekt hormoneze pojavljuje u drugom danu, dok se kod koncentracija od 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ i 100 mg L⁻¹ ona pojavljuje u prvom danu. Najpravilniji trend vidljiv je kod koncentracije od 75 mg L⁻¹, gdje nema pojave hormoneze, odnosno broj kolonija u uzorcima s rodanidima manji je od kontrole u svim danima provođenja ispitivanja i smanjuje se od prvog prema trećem danu, dok se broj kolonija u kontroli povećava.

Temeljem dobivenih vrijednosti logCFU dobivene su vrijednosti inhibicije za sve vrijednosti koncentracija rodanida. Rezultati su vidljivi na grafičkom prikazu na slici 21. Vidljivo je da vrijednosti inhibicije postepeno rastu s povećanjem koncentracije rodanida i najveća vrijednost inhibicije je upravo pri najvećoj vrijednosti koncentracije rodanida od 100 mg L^{-1} i ona iznosi 71,43 %. Na temelju dobivenih rezultata može se primijetiti da koncentracija rodanida od 100 mg L^{-1} ima značajan ekotoksični učinak na mikroalgu *Chlorella* sp.

5.3. Vrijednosti efektivne koncentracije, EC_x

Vrijednost efektivne koncentracije je koncentracija tvari koja se nalazi u okolišnom mediju, za koju se očekuje da će uzrokovati određeni učinak kod određenog postotka testnih organizama u određenoj populaciji pod definiranim skupom uvjeta. Tako je EC_{20} vrijednost koncentracije tvari koja uzrokuje određeni učinak kod 20 % testnih organizama, a EC_{50} je vrijednost koncentracije tvari koja uzrokuje određeni učinak kod 50 % testnih organizama u određenoj populaciji pod definiranim skupom uvjeta.⁸⁷ Vrijednosti efektivne koncentracije, EC_x , procijenjene su računski pomoću dobivenih vrijednosti inhibicije, odnosno pomoću jednadžbe pravca dobivenog iz ovisnosti prirodnog logaritma inhibicije o prirodnom logaritmu koncentracije. Procijenjene vrijednosti prikazane su u tablici 6. Kao što je vidljivo iz tablice, nije moguće usporediti EC_{20} vrijednosti između bakterije *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp. jer vrijednost EC_{20} za bakteriju *Pseudomonas putida* nije bilo moguće odrediti zbog toga što je vrijednost inhibicije pri najnižoj koncentraciji iznad 20 %. Moguće je usporediti vrijednosti EC_{50} dobivene za ispitivane organizme i prema njima možemo vidjeti da manja koncentracija, koja iznosi $36,23 \text{ mg L}^{-1}$, uzrokuje određeni učinak kod 50% organizama u populaciji mikroalge *Chlorella* sp. nego što je to u slučaju populacije bakterije *Pseudomonas putida* gdje isti takav učinak izaziva viša koncentracija koja iznosi $49,03 \text{ mg L}^{-1}$. Prema tome možemo pretpostaviti da rodanidi imaju veći ekotoksičan utjecaj na mikroalgu *Chlorella* sp. što je u skladu s dobivenim vrijednostima inhibicije gdje je vidljivo da rodanidi uzrokuju veću inhibiciju kod mikroalge *Chlorella* sp.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenih ispitivanja ekotoksičnosti rodanida na bakteriju *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp., moguće je zaključiti:

- najveća vrijednost inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida* uzrokovana rodanidima iznosi 59,17% što pokazuje značajniji ekotoksični učinak rodanida na bakterijsku kulturu
- najveća vrijednost inhibicije rasta mikroalge *Chlorella* sp. uzrokovana rodanidima iznosi 71,43% i postignuta je pri najvećoj vrijednosti rodanida od 100 mg L⁻¹, što pokazuje značajan ekotoksični učinak rodanida na mikroalgu
- uspoređujući maksimalne vrijednosti inhibicije rasta stanica bakterije i mikroalge vidljivo je da rodanidi imaju veći ekotoksični učinak na mikroalgu *Chlorella* sp.
- usporedbom vrijednosti EC₅₀ za bakteriju *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp., primjećuje se veći ekotoksični učinak rodanida na mikroalgu *Chlorella* sp.

7. POPIS KRATICA I SIMBOLA

EC₂₀ – efektivna koncentracija za 20% populacije

EC₅₀ – efektivna koncentracija za 50% populacije

ISO – engl. *International Standardization Organization*; Internacionalna organizacija za standardizaciju

OECD – engl. *Organization for Economic Colaboration and Development*; Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj

LD₅₀ – letalna doza za 50% populacije

NOEL/NOEC – engl. *No Observed Effect Level/No Observed Effect Concentration*; koncentracija bez uočenog učinka

LOEL/LOEC – engl. *Lowest Observed Effect Level/Lowest Observed Effect Concentration*; koncentracija najmanjeg uočenog učinka

SEM – engl. *Scanning Electron Microscope*; skenirajući elektronski mikroskop

CFU – engl. *Colony Forming Units*; jedinice koje tvore kolonije

CFU₀ – jedinice koje tvore kolonije u početnim uvjetima

INH – inhibicija

γ_D - masena koncentracija rodanida, mg L⁻¹

t - vrijeme

8. LITERATURA

1. Vázquez, I., Rodríguez, J., Marañón, E., Castrillón, L., Fernández, Y., Simultaneous removal of phenol, ammonium and thiocyanate from coke wastewater by aerobic biodegradation, *Journal of Hazardous Materials B137* (2006) 1773–1780
2. Ji, Q., Tabassum, S., Hena, S., Silva, C. G., Yu, G., Zhang, Z., A review on the coal gasification wastewater treatment technologies: past, present and future outlook, *Journal of Cleaner Production* 126 (2016) 38–55
3. Felföldi, T., Nagymáté, Z., Székely, A. J., Jurecska, L., Márialigeti, K., Biological treatment of coke plant effluents: from a microbiological perspective, *Biologia Futura* 71 (2020) 359–370
4. Kwiecinska, A., Lajnert, R., Bigda, R., Coke oven wastewater – formation, treatment and utilization methods – a review, *Proceedings of ECOpole, Towarzystwo Chemii i Inżynierii Ekologicznej, Opole*, 11 (2017) 19–28
5. Singh, H., Sonal, S., Mishra, B. K., Understanding the toxicity effect and mineralization efficiency of in-situ electrogenerated chlorine dioxide for the treatment of priority pollutants of coking wastewater, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211 (2021) 111907
6. Wu, Z., Zhu, W., Liu, Y., Zhou, L., Liu, P., Xu, J., An integrated biological-electrocatalytic process for highly efficient treatment of coking wastewater, *Bioresource Technology* 339 (2021) 125584
7. Wang, L., An, X., Xiao, X., Li, N., Treatment of thiocyanate-containing wastewater: a critical review of thiocyanate destruction in industrial effluents, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39 (1) (2022)
8. Vasseur, P., Masfaraud, J-F., Blaise, C., *Ecotoxicology, revisiting its pioneers*, *Environmental Science and Pollution Research* 28 (4) (2021) 1-6
9. Blaise, C., Ferard, J-F., *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Volume 2 – Hazard Assessment Schemes*, Springer (2005)
10. Lewis, M. A., *Algae and Vascular Plant Tests, Fundamentals of Aquatic Toxicology* (2020) 135-169
11. Franklin, N. M., Stauber, J. L., Lim, R. P., Petocz, P., Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (11) (2022) 2412-2422

12. Wang, W., Literature review on duckweed toxicity testing, *Environmental Research* 52 (1) (1990) 7-22
13. Rosner, A., Armengaud, J., Ballarin, L., Barnay-Verdier, S., Cima, F., Coelho, A. V., Domart-Coulon, I., Drobne, D., Geneviere, A-M., Jemec Kokalj, A., Kotlarska, E., Lyons, D. M., Mass, T., Paz, G., Pazdro, K., Perić, L., Ramšak, A., Rakers, S., Rinkevich, B., Spagnuolo, A., Cambier, S., Stem cells of aquatic invertebrates as an advanced tool for assessing ecotoxicological impacts, *Science of The Total Environment* 771 (2021) 144565
14. Edwards, C. A., Arancon, N. Q., *Biology and Ecology of Earthworms* (2022)
15. Singh, K., Kumar Kashyap, S., Garg, V., Use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for research in toxicological studies, *Journal of Applied and Natural Science* 13 (3) (2021) 846-852
16. Ankley, G. T., Villeneuve, D. L., The fathead minnow in aquatic toxicology: Past, present and future, *Aquatic Toxicology* 78 (2006) 91-102
17. Bacchetta, R., Pica, A., Santo, N., Tremolada, P., Sugni, M., Comparative effects of polyvinyl chloride microplastics on the brittle star *Ophiactis virens* and the amphibian *Xenopus laevis*, *Aquatic Toxicology* 272 (2024) 106975
18. Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., Krest, S. K., *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles* (2000)
19. Garcia-Fernandez, A. J., *Ecotoxicology, Avian*, *Encyclopedia of Toxicology* 3 (2014) 289-294
20. Gad, S. C., *Animal Model sin Toxicology* 2 (2006)
21. <https://www.solvairsolutions.com/en/industries-served/industrial-players/coking-industry> (10.5.2024.)
22. Kwiecinska, A., Lajnert, R., Bigda, R., Coke oven wastewater – formation, treatment and utilization methods – a review, *Proceedings of ECOpole, Towarzystwo Chemii i Inżynierii Ekologicznej, Opole*, 11 (2017) 19–28
23. Maiti, D., Ansari, I., Rather, M. A., Deepa, A., Comprehensive review on wastewater discharged from the coal-related industries – characteristics and treatment strategies, *Water Science and Technology* 79.11 (2019) 2023–2035
24. Li, H., Cao, H., Li, Y., Zhang, Y., Liu, H., Innovative Biological Process for Treatment of Coking Wastewater, *Environmental Engineering Science* 27 (2010) 313–322
25. Ivanchenko, A. V., Khavikova, K., Trukilo, A., Mathematical Modeling of the Processes of Wastewater Purification from Phenols and Rhodanides using Glaucanite, *Naukovyi Visnyk Natsionalnoho Hirnychoho Universytetu* 4 (2020) 111-116

26. Raper, E., Stephenson, T., Fisher, R., Anderson, D. R., Soares, A., Characterisation of thiocyanate degradation in a mixed culture activated sludge process treating coke wastewater, *Bioresource Technology* 288 (2019) 121524
27. Kim, J., Cho, K., Han, G., Lee, C., Hwang, S., Effects of temperature and pH on the biokinetic properties of thiocyanate biodegradation under autotrophic conditions, *Water Research* 47 (2013) 251–258
28. Chen, X., Yang, L., Sun, J., Dai, X., Ni, B-J., Modelling of simultaneous nitrogen and thiocyanate removal through coupling thiocyanate-based denitrification with anaerobic ammonium oxidation, *Environmental Pollution* 253 (2019) 974–980
29. Zhu, S., Wu, H., Wu, C., Qiu, G., Feng, C., Wei, C., Structure and microbial community involved in a novel full-scale prefix oxidic coking wastewater treatment O/H/O system, *Water Research* 164 (2019) 114963
30. Luthy, R. G., Bruce, S. G., Kinetics of reactions of cyanide and reduced sulphur species to form thiocyanates, Technical Report, US Department of Energy, US (1978)
31. Wechwithayakhlung, C., Packwood, D. M., Harding, D. J., Pattanasattayavong, P., Structures, bonding, and electronic properties of metal thiocyanates, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 154 (2021) 1100085
32. https://wwwn.cdc.gov/Nchs/Nhanes/2009-2010/PERNT_F.htm (5.7.2024.)
33. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/thiocyanate> (2.7.2024.)
34. Zidan, M., Wee Tee, T., Alaghbari, E. S., Shameli, M. A. K., Voltametric Oxidation of Potassium Thiocyanate using ErBa₂Cu₃O₇ Modified Glassy Carbon Electrode, *International Journal of Electrochemical Science* 8 (2013) 4818-4826
35. Qiao, K., Zeng, Y., Synergistic inhibition effect of Diantipyrylmethane and Potassium thiocyanate on mild steel corrosion in 1 M HCl solution, *International Journal of Electrochemical Science* 14 (2019) 6999-7015
36. Anejjar, A., Salghi, R., Zarrouk, A., Benali, O., Zarrok, H., Hammouti, B., Ebenso, E. E., Inhibition of carbon steel corrosion in 1 M HCl medium by potassium thiocyanate, *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* 15 (2014) 21-27
37. Jawale, R. H., Gogate, P. R., Novel approaches based on hydrodynamic cavitation for treatment of wastewater containing potassium thiocyanate, *Ultrasonics Sonochemistry* 52 (2019) 214-223
38. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/tiocijanati> (16.5.2024.)

39. Kabešova, M., Gažo, J., Structure and classification of thiocyanates and the mutual influence of their ligands, *Chemicke Zvesti* 34 (6) (1980) 800-841
40. Malecki, J. G., Gron, T., Duda, H., Structural, spectroscopic and magnetic properties of thiocyanate complexes of Mn(II), Ni(II) and Cu(II) with the 1-methylimidazole ligand, *Polyhedron* 36 (2012) 56-68
41. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/thiocyanate> (21.5.2024.)
42. Watson, C. J., Overbeek, D. L., Allegri-Machado, G., Kellogg, M. D., Patterson, A., McAlvin, J. B., Burns, M. M., Thiocyanate toxicity: a teaching case, *Clinical Toxicology* 60 (2022) 876- 881
43. Xiao, X., An, X., Jiang, Y., Wang, L., Li, Z., Lai, F., Zhang, Q., A newly developed consortium with a highly efficient thiocyanate degradation capacity: A comprehensive investigation of the degradation and detoxification potential, *Environmental Pollution* 318 (2023) 120878
44. Chang, W-H., Chen, P-H., Herianto, S., Chen, H-L., Lee, C-C., Aggregating exposures and toxicity equivalence approach into an integrated probabilistic dietary risk assessment for perchlorate, nitrate, and thiocyanate: Results from the National food monitoring study and National Food Consumption Database, *Environmental Research* 211 (2022) 112989
45. Yazici, E., Ucuncu, R., Deveci, H., Removal of thiocyanate from solutions by precipitation, XXV. International Mineral Processing Congress (2010)
46. Dizge, N., Demirbas, E., Kobya, M., Removal of thiocyanate from aqueous solutions by ion exchange, *Journal of Hazardous Materials* 166 (2009) 1367-1376
47. Zhou, H., Xiang, N., Xie, J., Diao, X., Ecotoxicology: The History and Present Direction, *Encyclopedia of Ecology* 2 (2018) 1-9
48. Valavanidis, A. , Vlachogianni, T. ,Ecotoxicity Test Methods and Ecological Risk Assessment. *Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology Tests under the Guidelines of International Organizations.* (2015) 1-29
49. Worth, A. P., Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing, u: M. Balls, R. Combes, A. P. Worth, *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*, London (2019) 7–10
50. Scott, J., Minghetti, M., *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology :Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology* (2020) 477-486
51. OECD, *Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition Test* (1984)
52. Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B., *Development of In Vitro Toxicology, In Vitro Toxicology* (2018) 1–19

53. Fisher, I., Milton, C., Wallace, H., Toxicity testing is evolving!, *Toxicology Research* 9 (2) (2020) 67-80
54. Tramontana, P., Velika vodenbuha (*Daphnia magna* Straus, 1820) kao plijen u slatkovodnom mikrokozmosu i primjena u nastavi, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (2021)
55. <https://www.fishbase.se/summary/4653> (19.5.2024.)
56. Eaton, D. L., Gilbert, S. G., Principles of Toxicology i Faustman, E. M., Omenn, G. S., Risk Assessmentu, u: Klaassen, C. D., *Toxicology* 8 (2013) 13-49
57. Babu, B., Wu, J.T., Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. *Science of Total Environment* 408 (2010) 4969–4975
58. https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html (24.5.2024.)
59. Clark, D. P., Pazdernik, N. J., Chapter 1 – Basics of Biotechnology, *Biotechnology* 2 (2016) 1-31
60. Guleria, A., Biodegradation of Pharmaceutical Waste 4-Nitrophenol by *Pseudomonas putida*, *Indian Journal of Research* 3 (2014) 127-130
61. Fendri, I., Chaari, A., Dhouib, A., Jlassi, B., Abousalham, A., Carriere, F., Sayadi, S., Abdelkafi, S., Isolation, Identification and Characterization of a New Lipolytic *Pseudomonas* sp., Strain AHD-1, from Tunisian Soil, *Environmental Technology* 82 (2010) 87-95
62. Kostal, J., Suchanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B., McBeth, D., L., *Pseudomonas* C12B, an SDS Degrading Strain, Harbours a Plasmid Coding for Degradation of Medium Chain Length n-alkanes, *International Biodeterioration & Biodegradation* 42 (1998) 221-228
63. Meade, M. J., Waddell, R. L., Callahan, T. M., Soil Bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* Inactivate Triclosan in Liquid and Solid Substrates, *FEMS Microbiology Letters* 204 (2001) 45-48
64. Tsang, K.W., Ng, P., Ho, P.L., Chan, S., Tipoe, G., Leung, R., Sun, J., Ho, J.C., Ip, M.S., Lam, W.K., Effects of erythromycin on *Pseudomonas aeruginosa* adherence to collagen and morphology in vitro, *European Respiratory Journal* 21 (2003) 401–406
65. Martínez-García, E., De Lorenzo, V., Engineering Multiple Genomic Deletions in Gram-negative Bacteria: Analysis of the Multi-resistant Antibiotic Profile of *Pseudomonas putida* KT2440, *Environmental Microbiology* 13 (2011) 2702-2716
66. Elmi, F., Lee, H. T., Huang, J. Y., Hsien, Y. C., Wang, Y. L., Chen, Y. J., Shaw, S. Y., Chen, C. J., Stereoselective Esterase from *Pseudomonas putida* IFO12996 Reveals α / β Hydrolase

- Folds for D-β-Acetylthioisobutyric Acid Synthesis, *Journal of Bacteriology* 187 (2005) 8470–8476
67. Ozaki, E., Sakimae, A., Numazawa, R., Cloning and Expression of *Pseudomonas putida* Esterase Gene in *Escherichia coli* and Its Use in Enzymatic Production of D-β-Acetylthioisobutyric Acid, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58 (1994) 1745–1746
68. <https://sciencephotogallery.com/featured/pseudomonas-putida-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html> (21.5.2024.)
69. Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Skripta iz laboratorijskih vježbi iz kolegija Ekotoksikologija, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2022/2023)
70. Scheffler, J., Underwater Habitats, *Illumin Magazine* 9 (4) (2007)
71. Widyaningrum, D., *Chlorella* as a Source of Functional Food Ingredients: Short review, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 794 (2021) 012148
72. Wu, H.-L., Hseu, R.-S., Lin, L.-P., Identification of *Chlorella* sp. isolates using ribosomal DNA sequences, *Graduate Institute of Agricultural Chemistry* 42 (2001) 115-121
73. Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, J. Z., Ruan, R., Characterisation of a microalga *Chlorella* sp. Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production, *Bioresource Technology* 102 (2011) 5138-5144
74. [Ramaraj] Ramaraj, R., Unpaprom, Y., Dussadee, N., Cultivation of Green Microalga, *Chorella vulgaris* for Biogas Purification, *International Journal of Scientific and Technology Research* 2 (2016) 1-11
75. https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-Chlorella-variabilis-and-Micractinium-conductrix-in-their-host-Paramecium_fig1_342173512 (26.5.2024.)
76. Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., Watanabe, F., Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health, *Nutrients* 12 (9) (2020) 2524
77. Nyholm, N., Källqvist, T., Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae, *Environmental Toxicology and Chemistry* 8 (1989) 689-703
78. Paul Marienfeld GmbH & Co., Counting grids, https://www.dutscher.com/data/pdf_guides/en/AMMARA.pdf (23.5.2024.)
79. Shigeoka, T., Sato, Y., Takeda, Y., Yoshida, K., Yamauchi, F., Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure – activity relationships, *Environmental Toxicology And Chemistry* 7 (1988) 847-854
80. Martens, W. J. M., Jetten, T. H., Rotmans, J., Niessen, L. W., Climate change and vector-borne diseases, *Global Environmental Change* 5 (1995) 195-209

81. Rieger P.-G., Meier, H.-M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., Knackmuss, H.-J., Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence, *Journal of Biotechnology* 94 (2002) 101-123
82. Plavšić, F., Lovrić, Z., Wolf Čoporda, A., Ježić Vidović, I. Z., Čepelak Dodig, D., Gretić, D., Đurašević, S., Siguran rad s kemikalijama, Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2014)
83. Hund-Rinke, K., Simon, M., Terrestrial Ecotoxicity of Eight Chemicals in a Systematic Approach, *Journal of Soils and Sediments* 5 (2005) 59-65
84. Ghiglione, J.-F., Martin-Laurent, F., Pesce, S., Microbial Ecotoxicology: An Emerging Discipline Facing Contemporary Environmental Threats, *Environmental Science and Pollution Research* 23(5) (2016) 3981-3983
85. Europski parlament i Vijeće Europske unije. Uredba (EZ) br. 1272/2008 (2008)
86. Fong, C. R., Bittick, S. J., Fong, P., Simultaneous synergist, antagonistic and additive interactions between multiple local stressors all degrade algal turf communities on coral reefs, *Journ. of Ecology*, 160 (2018) 1390-1400
87. <https://www.zeomic.co.jp/en/glossary/antibacterial/62> (pristup 12.7.2024.)

