

Određivanje ekotoksičnosti fenola na *Chlorella* sp. i *Pseudomonas putida*

Kuzmić, Leona

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:149:401091>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Leona Kuzmić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

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

Kandidatkinja **Leona Kuzmić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 26. lipnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Martina Miloloža, asistent, 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: 1. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Leona Kuzmić

Određivanje ekotoksičnosti fenola na *Chlorella* sp. i *Pseudomonas putida*

DIPLOMSKI RAD

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

Neposredni voditelji:

dr. sc. Martina Miloloža

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Dr. sc. Martina Miloloža

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, srpanj 2024.

SAŽETAK RADA

Posljednjih godina povećana je emisija industrijskih otpadnih voda. S obzirom na izuzetno široku industrijsku primjenu fenola, fenolni spojevi prisutni su u velikim količinama u otpadnim vodama. Prisutnost fenola u vodi može imati toksične učinke kao rezultat antropogenih i prirodnih aktivnosti. Fenoli se najčešće bioakumuliraju prirodnim procesima i mogu narušiti bioekološku ravnotežu. Već u niskim koncentracijama, fenoli mogu negativno utjecati na ljudsko zdravlje, dok kratkotrajna izloženost visokim koncentracijama može dovesti do trovanja. Zbog visoke reaktivnosti fenola u vodenom mediju, koja je posljedica prisutnosti hidroksilne skupine, fenolni spojevi stupaju u interakciju s anorganskim komponentama vodenog okoliša i mikroorganizmima. Ekotoksikološke studije provode se kako bi se procijenili učinci fenola na vodene organizme. U ovom radu istražen je utjecaj ekotoksičnosti fenola na tri testna organizma, morsku bakteriju *Vibrio fischeri*, mikroalgu *Chlorella* sp. i bakteriju *Pseudomonas putida*. Ispitivane koncentracije fenola bile su: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L. Tijekom eksperimenata mjerena je bioluminiscencija za bakteriju *Vibrio fischeri*, te broj živih stanica (CFU) mikroalgi i bakterije *Pseudomonas putida* tijekom 3 dana izlaganja. Cilj istraživanja bio je utvrditi ekotoksičnost fenola na tri testna organizma. Postotak inhibicije rasta mikroalge *Chlorella* sp. nakon 72 sata bio je 55,26 %, dok je inhibicija rasta *Pseudomonas putida* iznosila 46,97 %. Najveća inhibicija bioluminiscencije za bakteriju *Vibrio fischeri* od 84,52 % uočena je pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji fenola (100 mg/L), te se može zaključiti da je *Vibrio fischeri* najosjetljiviji od ispitivanih testnih organizama.

Ključne riječi: fenoli, ekotoksičnost, *Chlorella* sp., *Pseudomonas putida*, *Vibrio fischeri*

ABSTRACT

In recent years, the emission of industrial wastewater has increased. Given the extremely wide industrial use of phenol, phenolic compounds are present in large quantities in wastewater. The presence of phenol in water can have toxic effects as a result of anthropogenic and natural activities. Phenols are most frequently bioaccumulated by natural processes and can disturb the bioecological balance. Even at low concentrations, phenols can have a negative impact on human health, while short-term exposure to high concentrations can lead to poisoning. Due to the high reactivity of phenol in the water medium, which is due to the presence of the hydroxyl group, phenolic compounds interact with inorganic components of the water environment and microorganisms. Ecotoxicological studies are carried out to assess the effects of phenol on aquatic organisms. In this work, the influence of phenol ecotoxicity on three microorganisms, the marine bacterium *Vibrio fischeri*, the microalgae *Chlorella* sp. and the bacterium *Pseudomonas putida*, was investigated. The tested concentrations of phenol were: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L and 1 mg/L. During the experiment, bioluminescence was measured for the bacterium *Vibrio fischeri*, and the number of live cells (CFU) of microalgae and the bacterium *Pseudomonas putida* during 3 days of exposure. The aim of the study was to determine the ecotoxicity of phenol on three organisms. The percentage of growth inhibition of the microalgae *Chlorella* sp. after 72 hours was 55.26%, while the growth inhibition of *Pseudomonas putida* was 46.97%. The maximum growth inhibition of *Vibrio fischeri* was 84.52% at the highest tested concentration of phenol (100 mg/L), so it can be concluded that *Vibrio fischeri* is the most sensitive of the tested microorganisms.

Key words: phenols, ecotoxicity, *Chlorella* sp., *Pseudomonas putida*, *Vibrio fischeri*

SADRŽAJ

1.UVOD.....	4
2.OPĆI DIO	5
2.1. Koksna industrija	5
2.2. Izvori fenola u okolišu	5
2.2.1. Prirodni izvori	6
2.2.2. Antropogeni izvori	7
2.3.Fenoli	8
2.4. Ekotoksikologija	10
2.5. Testovi ekotoksičnosti.....	10
2.6. Ekotoksičnost fenola	11
2.6.1. Morska bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	15
2.6.2. Bakterija <i>Pseudomonas putida</i>	17
2.6.3. Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	18
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1.Materijali	20
3.1.1.Fenoli.....	20
3.1.2. Testni mikroorganizmi	20
3.2.Mediji i kemikalije.....	21
3.2.1. Podloga za održavanje bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	21
3.2.2.Otopina za resuspenziju.....	21
3.2.3. Medij za uzgoj mikroalgi – bazalni medij	22
3.2.4. Mineralni medij.....	22
3.2.5. Hranjivi agar	23
3.3. Mjerni instrumenti i oprema	23
3.4.Metode rada	24
3.4.1. Test ekotoksičnosti primjenom <i>Vibrio fischeri</i>	24
3.4.2.Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.....	26
3.4.3.Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	28
4.REZULTATI.....	31
4.1.Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	31

4.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	32
4.3. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	34
5.RASPRAVA	37
5.1. Ispitivanje ekotoksičnosti fenola primjenom <i>Vibrio fischeri</i>	37
5.2. Ispitivanje ekotoksičnosti fenola primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	38
5.2. Ispitivanje ekotoksičnosti fenola primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	39
6.ZAKLJUČAK	40
7. POPIS KRATICA I SIMBOLA	41
8. LITERATURA.....	42

1.UVOD

Porast ljudske populacije dovodi do povećane potražnje za vodom koja je neophodna za održavanje svakog oblika života. Sve veće onečišćenje vode otpadom ispuštenim iz različitih izvora poput kućanstava, industrije i poljoprivrede uvelike je pridonijelo padu kvalitete i količine pitke vode.¹ Industrijske otpadne vode mogu sadržavati toksične spojeve stoga su potrebne odgovarajuće strategije obrade i upravljanja te ispuštanja otpadnih voda u okoliš kako bi se izbjegli negativni učinci na okoliš i zdravlje ljudi. Fenolni spojevi naširoko se koriste u različitim industrijama, uključujući boje, gnojiva, površinski aktivne tvari, eksplozive, tekstil, gumu, plastiku, sredstva za stvrdnjavanje i antioksidanse.² Onečišćenje fenolima i njegovim derivatima dopijeva u okoliš preko otpadnih voda ispuštenih iz industrija kao što su petrokemija, prerada hrane, te iz proizvodnja plastike, čelika, farmaceutskih proizvoda.³ Fenoli stvaraju niz derivata u vodi putem različitih kemijskih reakcija kao što su oksidacija i dezinfekcija.⁴ Zbog sve većeg porasta industrija i otpadnih voda veliki interes predstavljaju ekotoksikološki utjecaji fenola i njegovih spojeva u niskim koncentracijama na organizme i mikroorganizme prisutne u vodi i tlu zbog mogućih štetnih promjena u ekosustavu koje utječu i na ljude. Kako bi se riješili ekološki i zdravstveni problemi koje stvara industrijska otpadna voda, važno je ispitati njenu toksičnost kako bi se potencijalno toksične tvari mogle ukloniti fizikalno-kemijskim ili biološkim procesom. Toksikologija kao znanost podrazumijeva proučavanje štetnih učinaka kemijskih, fizikalnih ili bioloških uzročnika na žive organizme i ekosustav te uključuje sprječavanje takvih štetnih učinaka.⁵ Važnu ulogu u održavanju ekosustava funkcionalnim imaju mikroorganizmi. Testovi ekotoksičnosti provode se na različitim organizmima za sve potencijalno štetne tvari kako bi se odredili potencijalno štetni učinci ispitivanih tvari na ljude i životinje te sam okoliš. U cilju ispitivanja ekotoksičnog učinka fenola, u ovom su radu provedeni testovi ekotoksičnosti na tri organizma: morsku bakteriju *Vibrio fischeri*, bakteriju *Pseudomonas putida* te mikroalgu *Chlorella* sp. Testovi ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri* su se provodili tijekom 30 min, dok je izlaganje za testove primjenom ostala dva organizma trajalo 3 dana. Mjerenjem smanjenja bioluminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* te smanjenjem ukupnog broja živih stanica *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp., utvrđivala se ekotoksičnost fenola.

2.OPĆI DIO

2.1. Koksna industrija

Velika količina otpadnih voda koje nastaju u proizvodnom procesu kemijske industrije ugljena, kao što su otpadne vode od rasplinjavanja te otpadne vode od ukapljivanja i koksiranja, glavni su izvor kemijskih otpadnih voda, koje imaju veliki učinak i teško ih je ukloniti.⁶ Prema statističkim podacima, više od 50 % od gotovo 18 milijardi tona industrijskih otpadnih voda koje su ispuštene 2017. godine dolazi iz kemijske industrije ugljena.⁷ Prosječni sastav otpadne vode uključuje fenol u koncentraciji od 1000–1400 mg/L, amonijačni dušik 2000 mg/L, cijanid 7–70 mg/L, a sadrži i heterocikličke spojeve poput ulja i piridina i policikličke aromatske spojeve poput bifenila i naftalena (PAH). Otpadne vode koje sadrže fenol, uglavnom sadrže fenolne spojeve, kao što su fenol, hidrokinon i krezol.⁸ Otpadne vode iz kemijske industrije ugljena koje sadrže fenol sadrže mnoge toksične i štetne onečišćujuće tvari, što otežava njihovu razgradnju biokemijskim procesom obrade. Ako otpadna voda iz kemijske industrije ugljena koja sadrži fenol ne može zadovoljiti standard ispuštanja, otjecat će u vodeno tijelo, što će neizbježno uzrokovati nepopravljivu štetu okolišu i utjecati na dugoročni razvoj čovjeka i društva.⁹ Mogućnost učinkovitog pročišćavanja otpadnih voda koje sadrže fenol povezana je s razvojem kemijske industrije ugljena i zaštite okoliša. To je postalo ključna briga kemijske industrije ugljena. Otpadne vode koje sadrže kemijski fenol sadrže velik broj toksičnih onečišćujućih tvari. Zbog svoje složenosti, jedan proces pročišćavanja ne može zadovoljiti zahtjeve pročišćavanja otpadnih voda. Potrebno je fleksibilno kombinirati različite procese pročišćavanja u kombinaciji s karakteristikama kvalitete otpadnih voda i procesa.¹⁰ Tradicionalni postupak obrade otpadnih voda koje sadrže fenol u kemijskoj industriji ugljena uglavnom se sastoji od tri dijela: fizikalno-kemijska prethodna obrada, mikrobna obrada i napredna obrada.¹¹ Otpadne vode koje sadrže fenol iz kemijske industrije ugljena ne zadovoljavaju standard ispuštanja nakon prethodne obrade i biokemijske obrade već je potrebna i napredna obrada.

2.2. Izvori fenola u okolišu

Neki fenolni spojevi prisutni su u prirodi i povezani su s bojama cvijeća i voća.¹² Drugi su sintetizirani i koriste se u različitim aspektima svakodnevnog života. U vodenim tijelima fenolni spojevi prisutni su zbog ispuštanja onečišćene otpadne vode iz industrijskih, poljoprivrednih i kućanskih aktivnosti. Njihova prisutnost može biti posljedica razgradnje ili razgradnje prirodne

organske tvari prisutne u vodi, odlaganjem industrijskog i kućnog otpada u vodena tijela i otjecanjem s poljoprivrednih zemljišta.¹³ Oni također nastaju i kao posljedica prirodnih pojava. Prirodni izvori fenolnih spojeva u onečišćenju vode uključuju razgradnju mrtvih biljaka i životinja odnosno organske tvari u vodi. Također ih sintetiziraju mikroorganizmi i biljke u vodenom okolišu. Neki fenoli mogu nastati kao rezultat prirodnih procesa poput stvaranja fenola i *p*-krezola tijekom razgradnje organske tvari ili sinteze kloriranih fenola od strane gljiva i biljaka.¹⁴ Fenolni spojevi mogu djelovati štetno na organizam, čak i pri niskim koncentracijama. Interakcija fenolnih spojeva s mikroorganizmima, anorganskim i ostalim organskim spojevima u vodi može dovesti do proizvodnje supstituiranih spojeva koji mogu biti jednako toksični kao i izvorni fenolni spojevi.¹⁵

2.2.1. Prirodni izvori

Pojava fenolnih spojeva u vodi posljedica je razgradnje mrtvih biljaka i životinja u vodenim tijelima. Također njihova pojava može biti rezultat otjecanja s tla gdje se materijali koji se raspadaju ispiraju u vodena tijela. Fenolni spojevi sastavni su dijelovi mnogih biljnih vrsta, vodenih i kopnenih. Neki od tih spojeva nastaju iz aminokiselina koje su prisutne u hemicelulozi nekih biljaka, pod ultraljubičastim zračenjem. Na primjer, poznato je da kora vrbe sadrži određenu količinu salicilne kiseline.¹⁶ Zelene i crvene morske alge također sadrže makromolekule fenolnih spojeva, dok hidroksibenzen nastaje zbog razgradnje organske tvari.¹⁷ Tijelo ljudi i životinja proizvodi fenol koji se na kraju izlučuje. Tako metabolički otpadni proizvodi ljudi i životinja također sadrže fenol.¹⁸ Spojevi su također sastavni dijelovi mnogih prehrambenih proizvoda, uključujući voće i povrće. Utvrđeno je da je fenol prirodno prisutan u katranu ugljena i krezotu. Također se proizvodi tijekom prirodnih požara, te razgradnjom benzena u atmosferi pod utjecajem ultraljubičastog zračenja.¹⁹ Izravna razgradnja ovih materijala u vodi ili neizravno unošenje iz otjecanja i oborina rezultira onečišćenjem voda. Potencijal mikroorganizama da razgrade prirodne supstrate u fenolne spojeve, posebice hidroksibenzoat, dobro je utvrđen.²⁰ *Debaryomyces hansenii* poznat je po svojoj sposobnosti pretvaranja ferulinske kiseline u različite fenolne spojeve u prisutnosti glukoze i dušika.²¹ Također je poznato da fermentacija biljnih ekstrakata pomoću mikroorganizama dovodi do stvaranja različitih vrsta fenolnih spojeva. Sinteza fenolnih spojeva u biljkama odvija se u klorofilu pod utjecajem određenih vanjskih čimbenika poput ultraljubičastog zračenja sunčeve svjetlosti, kationa, pesticida i mikrobne infekcije. Korijenje i izlučevine lišća biljaka sadrže fenolne

spojeve, koji se putem izlučevina unose u tlo. Razgradnja mrtvog lišća, korijenja i biljaka također unosi fenolne spojeve u tlo. Otjecanje s kopna zatim ispire te spojeve u obližnja vodena tijela.

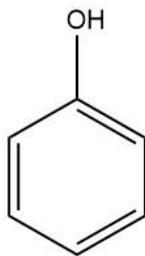
2.2.2. Antropogeni izvori

Fenoli antropogenog podrijetla u okolišu su prisutni zbog aktivnosti kemijske, benzinske ili farmaceutske industrije. Spojevi prodiru u ekosustave kao rezultat drenaže komunalne ili industrijske kanalizacije u površinske vode.²² Najčešći antropogeni izvori fenola u prirodnoj vodi uključuju katran ugljena²³ i otpadne vode iz proizvodnih industrija kao što su smole, plastika, vlakna, ljepila, željezo, čelik, aluminij, koža, guma²⁴ te otpadne vode iz proizvodnje sintetičkog goriva. Fenol se također oslobađa iz tvornica papirne celuloze²⁵ i postrojenja za obradu drva²⁶. Ostala otpuštanja fenola rezultat su komercijalne uporabe fenola i proizvoda koji sadrže fenol, uključujući dezinficijense i medicinske pripravke. Fenol je sastavni dio mnogih kućanskih kemikalija. Prisutan je u dezinfekcijskim sredstvima i antisepticima. Medicinski ili farmaceutski proizvodi, poput losiona za tijelo, masti, vodice za ispiranje usta i neki oralni sprejevi namijenjeni anesteziji i liječenju upale grla, svi sadrže fenol. On je također prisutan u drugim kućanskim proizvodima kao što su sapuni, igračke, boje, lakovi, parfemi i sredstva za uklanjanje laka.²⁷ Industrijske aktivnosti kao što su destilacija drva, upotreba klora za dezinfekciju vode, procesi kuhanja i proizvodnja papira rezultiraju stvaranjem klorofenola.²⁸ Izravno ili neizravno ispuštanje otpadnih voda i priljeva iz tih industrijskih aktivnosti u vodena tijela kulminira njihovim onečišćenjem fenolnim spojevima. Neki od ovih spojeva također se ispuštaju u atmosferu kroz aktivnosti vozila i na kraju se ispiru u vodena tijela kao kišnica. Fenolni spojevi sastojci su pojedinih pesticida i insekticida. Primjena pesticida, insekticida i herbicida glavni je izvor onečišćenja vode fenolnim spojevima kroz poljoprivredu. Herbicidi, fungicidi i pesticidi sa svojim produktima razgradnje ispiru se u vodena tijela prilikom otjecanja kroz poljoprivredno zemljište. Efluenti i pritoci koji proizlaze iz postrojenja za obradu komunalnog otpada i procjedne vode s odlagališta komunalnog krutog otpada još su jedan izvor fenolnih spojeva. Otpadne vode iz koksne industrije karakterizira izuzetno složen kemijski sastav, koji se sastoji od organskih i anorganskih spojeva. Sadržaj otpadne vode iz koksne industrije može se podijeliti na netopljive (suspendirane i koloidne) čestice i otopljene organske (hidrofobne i hidrofilne) tvari. Glavne onečišćujuće tvari otpadnih voda od koksiranja su fenoli koje nastaju razgradnjom organskih spojeva tijekom proizvodnje koksa. Tijekom razgradnje fenola nastaje niz intenzivno

obojenih aromatskih spojeva koji otpadnoj vodi daju tamnosmeđu boju. Tijekom proizvodnje koksa dolazi do stvaranja velike količine fenola od 0,3 do 12 kg po toni proizvedenog koksa.^{29,30} Prisutnost fenola (≥ 200 mg/L) u otpadnoj vodi ometa biorazgradnju tiocijanata, utječe na nitrifikaciju i inhibira denitrifikaciju.

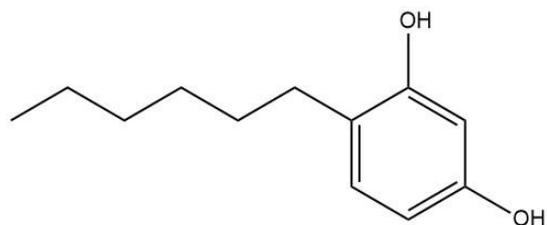
2.3.Fenoli

Fenoli su organski spojevi karakterizirani hidroksilnom (—OH) skupinom vezanom za ugljikov atom koji je dio aromatskog prstena.³¹ Fenol je također specifično ime za njegov najjednostavniji član, monohidroksibenzen ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), poznat kao benzenol ili karbolna kiselina (Slika 1.). Svi ostali članovi skupine su derivati fenola.



Slika 1. Prikaz strukture monohidroksibenzena.

Fenoli u odnosu na alkohole stvaraju jače vodikove veze stoga su topljiviji u vodi i imaju više točke vrelišta. Pojavljuju se kao bezbojne tekućine ili bijele krutine na sobnoj temperaturi te mogu biti vrlo otrovni i kaustični. Fenoli se koriste u proizvodima za kućanstvo i kao intermedijeri za industrijsku sintezu. U niskim koncentracijama koristi se kao dezinfekcijsko sredstvo u sredstvima za čišćenje kućanstva i vodici za ispiranje usta.² Godine 1865. britanski kirurg Joseph Lister promovirao je ideju sterilizacije u kirurgiji korištenjem fenola kao antiseptika.³² S fenolom korištenim na ovaj način, stopa smrtnosti od kirurških amputacija je pala, no fenol je prilično otrovan. Koncentrirane otopine uzrokuju teške, ali bezbolne opekline kože i sluznice. Manje toksični fenoli, kao što je n-heksilrezorcinol istisnuli su sam fenol u kapima protiv kašlja i drugim antiseptičkim primjenama (Slika 2).²



Slika 2. Prikaz strukture 4-heksilrezorcina.

Fenol i njegovi derivati imaju određena kemijska i fizikalna svojstva povezana s njihovim izvorima i sektorima primjene. Pri standardnoj temperaturi i tlaku, fenol i njegovi derivati su aromatski organski spojevi s higroskopnom kristalnom krutom strukturom.³³ Butilirani hidroksitoluen (BHT) ima mnogo manju toksičnost i čest je antioksidans u hrani. U industriji se fenol koristi kao početni materijal za proizvodnju plastike, te eksploziva kao što je pikrinska kiselina i lijekova kao što je aspirin. Supstituirani fenoli koriste se u industriji boja za izradu intenzivno obojenih azo boja. Mnogi su fenolni spojevi otkriveni i korišteni prije nego što je određena njihova struktura. Stoga se za najčešće fenolne spojeve često koriste trivijalni nazivi (tj. vanilin, salicilna kiselina, krezol i hidrokinon).³⁴ Sustavni nazivi specificiraju stvarnu strukturu spoja. Ukoliko je hidroksilna skupina glavna funkcionalna skupina fenola, spoj se može nazvati supstituiranim fenolom, s atomom ugljika koji nosi hidroksilnu skupinu. Fenoli sa samo jednim drugim supstituentom mogu se imenovati pomoću odgovarajućih brojeva ili orto, meta i para sustava. Spojevi s drugim glavnim funkcionalnim skupinama mogu se imenovati s hidroksilnom skupinom kao hidroksi supstituentom. Slično alkoholima, fenoli imaju hidroksilne skupine koje mogu sudjelovati u stvaranju međumolekularnih vodikovih veza odnosno fenoli teže stvaranju jačih vodikovih veza od alkohola što rezultira višim talištem i višim točkama vrenja za fenole nego za ugljikovodike sa sličnim molekulskim masama.³¹ Sposobnost fenola da stvaraju jake vodikove veze također povećava njihovu topljivost u vodi. Fenoli i njihovi derivati često postoje u okolišu. Oni se koriste kao komponente boja, lijekova, polimera i drugih organskih tvari. Njihova prisutnost u ekosustavima povezana je i s proizvodnjom i razgradnjom brojnih pesticida te nastajanjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Fenoli također nastaju i prirodnim procesima. Mogu biti supstituirani s atomima klora, nitrirani, metilirani ili alkilirani. Fenoli su

štetni ekotoksini. Ekotoksini, odnosno okolišni toksini, obuhvaćaju heterogenu skupinu kemijskih spojeva.³⁵

2.4. Ekotoksikologija

Izraz ekotoksikologija prvi uvodi francuski toksikolog Rene Truhaut 1969. godine. Ekotoksikologija dolazi od riječi ekologija i toksikologija. Nakon toga dolazi do proučavanja negativnog utjecaja tvari na sva živa bića, a ne samo čovjeka.³⁶ Ekotoksikologija je definirana kao interdisciplinarna znanost koja obuhvaća proučavanje utjecaja kao posljedica prirodnih i antropogenih toksičnih tvari na sve žive organizme, ljude, životinje, biljke i cijeli ekosustav. Ekotoksikologija kao znanost uključuje brojna područja: ekologiju, fiziologiju, toksikologiju, patofiziologiju i ekofiziologiju.³⁷ Štetni utjecaj definiran je kao svojstvo tvari da izazove promjenu, deformaciju ili smrt u živom organizmu. Tvari koje mogu izazvati štetnu reakciju, poznate i kao toksikanti, mogu se klasificirati kao:

- otrovne tvari (prirodno prisutni ili sintetički ksenobiotici) i
- toksini (proizvod drugih živih organizama koji izazivaju toksične reakcije).³⁸

2.5. Testovi ekotoksičnosti

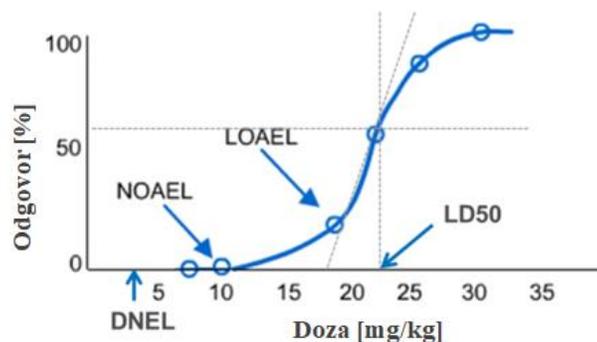
Metode za određivanje potencijalno toksičnih tvari su različiti testovi ekotoksičnosti na testnim organizmima pri čemu se oni izlažu onečišćujućim tvarima kako bi se utvrdio potencijalno štetni utjecajana reprodukciju, rast, ponašanje, preživljavanje i druge osobine.³⁹ Testovi se mogu koristiti kako bi se definirala akutna toksičnost pri čemu se testni organizmi izlažu ispitivanoj tvari u kraćem vremenskom period te u svrhu definiranja kronične toksičnosti kod koje su testni organizmi izloženi ispitivanoj tvari tijekom duljeg vremenskog perioda.⁴⁰ Razlikujemo još jednu podjelu testova, a to je *in vivo* (na živim organizmima) i *in vitro* testovi (na stanicama ili tkivima). *In vivo* testovi provode se za određivanje općenitog utjecaja na organizam, dok se *in vitro* testovi provode ukoliko se želi odrediti utjecaj na pojedini dio organizma. Testovi toksičnosti provode se u skladu sa zakonskom regulativom.⁴¹ Neki od *in vitro* testova su:

- bakterije (npr. *Vibrio fischeri*; ISO 11348:200754)⁴²
- kvasci (npr. *Saccharomyces cerevisiae* ; ISO 19040-1:201855)⁴³
- slatkovodne i morske alge (OECD 201:1984)⁴⁴
- biljke (npr. *Lemna minor*; ISO 20079:2005)⁴⁵

- drugi beskralježnjaci i embriji – manjih riba (ISO 21115:RTgill-W1).⁴⁶

Kako bi se procijenio ekološki rizik, važnu ulogu ima krivulja doza-odgovor. Testovi toksičnosti najčešće se provode tako da se testni organizam izlaže potencijalno toksičnim tvarima pri čemu se u određenim vremenskim razmacima mjeri zadani parameter. Nakon toga dobiveni se podaci kod izloženih vrste uspoređuju s podacima za neizložene vrste.⁴⁷ Nakon dobivenih eksperimentalnih podataka slijedi modeliranje krivulje doza-odgovor kako bi se odredila najniža doza odnosno koncentracija tvari koja se ispituje te koja izaziva prvi učinak kao i najveća doza odnosno koncentracija bez učinka. Pojmovi pomoću kojih se izražavaju rezultati su:

- LC₅₀ (engl. lethal concentration) – koncentracija tvari koja je smrtonosna za 50 % istraživanih jedinki u testu ekotoksičnosti
- EC₅₀ (engl. effective concentration) – koncentracija tvari kod koje su štetni učinci vidljivi kod 50 % promatranih organizama
- IC₅₀ (engl. inhibitory concentration) – koncentracija određene tvari, primjerice farmaceutika, pesticida ili druge onečišćujuće tvari), potrebna za 50 %-tnu inhibiciju biološkog procesa.⁴⁸



Slika 3. Krivulja *doza-odgovor* s ključnim paramterima⁴⁹

2.6. Ekotoksičnost fenola

Toksično djelovanje fenola proizlazi iz neodređene toksičnosti koja je povezana s hidrofobnošću i stvaranjem organskih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva. Fenoli pokazuju sposobnost peroksidacije, hematotoksični su i hepatotoksični odnosno izazivaju mutagenozu i karcinogenozu

prema ljudima i drugim živim organizmima.⁵⁰ Toksičnost fenola povezana je s dva procesa. Jedan je nespecificirana toksičnost koja je povezana s hidrofobnosti pojedinog spoja, dok je drugi stvaranje slobodnih radikala.⁵¹ Svojstvo hidrofobnosti utječe na topljivost fenola u staničnim tekućinama te na taj način utječe i na moguće interakcije spoja s određenim dijelovima stanica i tkiva. Na primjer, povećanje hidrofobnosti klorofenola povezano je s povećanjem broja atoma klora koji pojačava toksičnost pojedinog spoja.⁵² Jačina toksičnog utjecaja spoja također proizlazi iz lokalizacije supstituenta. Na primjer, atom klora supstituiran u orto položaju u molekuli fenola smanjuje njegovu toksičnost, dok meta supstitucija povećava toksično djelovanje spoja. Fenoli, nakon prodiranja u stanicu, podliježu aktivnoj transformaciji, uglavnom uz sudjelovanje oksidaza unutar citokroma P450. Moguće je i povećanje toksičnosti pojedinih spojeva stvaranjem elektrofilnih metabolita koji se mogu vezati i oštetiti DNA ili enzime. Štetan utjecaj fenola i njihovih derivata odnosi se na akutnu toksičnost, histopatološke promjene, mutagenost i kancerogenost.⁵³ Nedavno je došlo do povećane zabrinutosti znanstvenika u vezi s učincima izloženosti ljudi i životinja kemijskim spojevima u okolišu, posebice u vodenom okolišu. Fenolni spojevi su među kemikalijama koje izazivaju veliku zabrinutost u tom pogledu jer imaju tendenciju postojati u okolišu tijekom dugog vremenskog razdoblja, nakupljati se i imati toksične učinke na ljude i životinje.⁵⁴ Fenol se smatra glavnom onečišćujućom tvari zbog svojih štetnih i toksičnih učinaka, a može se akumulirati u živim organizmima. Razina fenola u pitkoj vodi i otpadnim vodama ograničena je međunarodnim aktom i svaka je zemlja predložila mnoge profitne i neprofitne agencije, kao što su Američka agencija za zaštitu okoliša i Svjetska zdravstvena organizacija. Izravno ili neizravno izlaganje fenolu može poremetiti metabolički sustav u mikroorganizmu, ljudskom ili životinjskom. Fenol u živi organizam ulazi kroz tri različita puta: dermalnim kontaktom, gutanjem i udisanjem.⁵⁵ Mikroorganizmi prisutni u okolišu bili su izloženi fenolnom onečišćenju što je dovelo do brojnih studija kako bi se pronašao niz vrsta koje se mogu aklimatizirati, iskoristiti i razviti mehanizam za mineralizaciju fenola u ne štetnu tvar.⁵⁶ U posljednjih nekoliko desetljeća, *Pseudomonas* sp. smatran je glavnim organizmom koji može iskoristiti fenol kao jedini ugljik.⁵⁷ Kafka i sur.⁵⁸ ispitivali su akutnu toksičnost fenola mjerenjem luminiscencije fotometrom uz korištenje *Photobacterium phosphoreum*. Rezultati su pokazali da se akutna toksičnost fenola smanjuje sa smanjenjem udaljenosti supstituenata na benzenskom prstenu, a niža vrijednost akutne toksičnosti može se naći za spojeve sa supstitucijom u orto-položaju. Prisutnost atoma klora također je povećala

toksičnost. Guerra i sur.⁵⁹ proveli su ekotoksikološka ispitivanja fenola s *B. plicatilis* i *A. salina*. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tablici 1. zajedno s rezultatima ispitivanja koje su proveli Kaiser i sur.⁶⁰ na testnom organizmu *P. phosphoreum* te Keen i sur.⁶¹ na *D. magna*. *Daphnia magna* pokazala se kao najosjetljiviji organizam. U ovom eksperimentu *V. fischeri* također pokazuje visoku osjetljivost na fenol.

Tablica 1. Prikaz EC₅₀ i LC₅₀ vrijednosti za fenole na ispitivanim testnim organizmima.

Testni organizam	Vrijeme izlaganja	EC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)	Literatura
<i>P. phosphoreum</i>	5 min	22,04	-	20
<i>D. magna</i>	48 h	6,60	-	21
<i>B. plicatilis</i>	24 h	-	16,76	19
<i>A. salina</i>	24 h	-	17,35	

Aruoja i sur.⁶² proveli su ispitivanje na 58 supstituiranih anilina i fenola pomoću 72-satnog testa inhibicije rasta algi s *Pseudokirchneriella subcapitata* i 15-minutnog testa inhibicije bioluminiscencije *Vibrio fischeri*. Molekule su bile supstituirane s jednom, dvije ili tri skupine odabrane između -kloro, -metil ili -etil. Eksperimentalno dobivene vrijednosti EC₅₀ za mikroalge kretale su se od 1,43 mg/L (3,4,5-trikloroanilin) do 197 mg/L (fenol), a za *V. fischeri* od 0,37 mg/L (2,3,5-triklorofenol) do 491 mg/L (anilin). Samo pet od 58 ispitanih kemikalija pokazalo je inhibicijski učinak na mikroalge u koncentracijama >100 mg/L. Zauzeti para-položaj imao je tendenciju povećanja toksičnosti, dok je većina orto-supstituiranih bila najmanje toksična. Rezultati su pokazali da što je veći broj supstituenata, to je veća hidrofobnost i toksičnost.⁶² Unatoč njihovoj toksičnosti, fenole mogu tolerirati i razgraditi brojni mikroorganizmi. U istraživanju koje su proveli Scragg i sur.⁶³ pokazalo se da bakterije, gljive i smeđa alga *Ochromonas danica* rastu na fenolu kao jedinom izvoru ugljika i energije. Početni rast *C. vulgaris* i *Chlorella* VT-1 bio je inhibiran u različitim stupnjevima s fenolima koncentracija od 100–400 mg/L, no rast *Chlorella* VT-1 nakon 7 dana nastavio se istom brzinom kao kontrola.⁶⁴ Inhibicija rasta *Chlorella* VT-1 imala je LC₅₀ 450 mg/L, što je bilo više od vodene leće *Lemna gibba*.⁶⁴ Toksičnost fenola pripisuje se poremećaju membranskih struktura zbog hidrofobnih interakcija.⁶⁵ Raspodjela lipofilnih spojeva u membranu može uzrokovati značajne promjene u

strukturi i funkciji membrane. Pokazalo se da fenol povećava stupanj zasićenosti lipida membrane u *Pseudomonas putida*^{66,67}, što može biti dio prilagodbe na fenol. Alternativno, smanjenje stope rasta kada se kulturi doda fenol moglo bi biti posljedica smrti dijela stanica. To je dokazano u kulturama *Chlamydomonas angulose* gdje je naftalen ubio oko 98 % stanica pri dodatku, ali nakon 3 dana stopa rasta se vratila na onu u kontroli. Gomma i sur.⁶⁸ ispitali su utjecaj različitih koncentracija fenola (200 – 1000 mg/L) na *Chlorella* sp. u uvjetima svjetla i tame. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz učinka različitih koncentracija fenola na uklanjanje fenola i rast stanica *Chlorella* sp. u uvjetima svjetla i tame.⁶⁸

$\gamma(\text{fenol}) / \text{mg/L}$	Uvjeti rasta	Inhibicija rasta (%)	Uklanjanje fenola (%)
200	svjetlo	-44,20	88,52
400	svjetlo	-2,56	45,69
400	svjetlo	4,05	49,57
600	svjetlo	35,52	16,61
600	svjetlo	32,29	29,23
600	svjetlo	36,98	32,72
800	svjetlo	37,04	13,55
800	svjetlo	30,82	8,42
1000	svjetlo	25,55	7,49
200	tama	-43,78	88,52
400	tama	-6,33	51,51
400	tama	-6,84	51,51
600	tama	36,15	17,23
600	tama	12,78	32,13
600	tama	15,85	45,93
800	tama	26,04	15,55
800	tama	15,56	18,41
1000	tama	22,56	7,86

Visoke koncentracije fenola (> 400 mg/L) pokazale su inhibitorne učinke na rast *Chlorella*. Ovi rezultati pokazuju da fenol ima učinak hormeze na mikroalge, koji je karakteriziran niskom dozom stimulacije i visokom dozom inhibicije. Vrijednosti inhibicije rasta dobivene u ovom istraživanju nisu prelazile 50 %. To implicira da je efektivna koncentracija fenola koja može uzrokovati 50 % inhibiciju (EC₅₀) na stanicama *Chlorella* bila iznad 1000 mg/L. U mnogim prethodnim studijama utvrđene su sljedeće vrijednosti za fenole: EC₅₀ iznosila je 155 mg/L za *Dunaliella salina*⁶⁹, 74 mg/L za *Entomoneis cf punctulata*⁷⁰, 174 mg/L za *Pseudokirchneriella subcapitata*⁷¹, 80 mg/L za *Microcystis aeruginosa*, 403 mg/L za *Scenedesmus quadricauda* i 631,4 mg/L za *Chlorella pyrenoidosa*.⁷² Postoji nekoliko biotičkih i abiotičkih čimbenika koji mogu utjecati na unos i fiktoksičnost fenola, kao što su omjer stanične površine i volumena, varijacije u prilagodbi na toksične spojeve, vrijeme izlaganja i uvjeti okoliša.⁷³

2.6.1. Morska bakterija *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je Gram negativna štapičasta morska bakterija koja ima svojstvo bioluminiscencije.⁷⁴ Morska bakterija *Vibrio fischeri* najbolje je poznata kao specifični simbiot u svjetlosnim organima određenih lignjanja (slika 4). Odnos između *V. fischeri* i *E. scolopes* karakteriziran je dnevnim ritmičkim ciklusima koji kontroliraju populacijsku dinamiku bakterija. Noću dok su životinje u vodenom stupcu i hrane se, svjetlosni organ ispunjen je bioluminiscentnom *V. fischeri*.⁷⁵ U zoru se lignje zakopaju u pijesak i izbace otprilike 90 % bakterijske populacije u okolni okoliš. Preostale bakterije u svjetlosnom organu dijele se, stvarajući svježije bioluminiscentnu populaciju do noći. Određeni bioluminiscentni sojevi *V. fischeri* stvaraju korisne odnose s morskim lignjama i ribama, ali te su bakterije metabolički fleksibilne i stoga nisu ograničene na okolinu domaćina.⁷⁵ Kako je *Vibrio fischeri* bakterija koja se nalazi u oceanu, njen optimalan rast u laboratoriju odražava te uvjete. Optimalan rast događa se na 24 °C do 28 °C u okruženju s visokim sadržajem soli (~20 g/L). Visoke temperature (iznad 34 °C za neke sojeve) pokazale su se smrtonosnim za bakteriju.⁷⁶

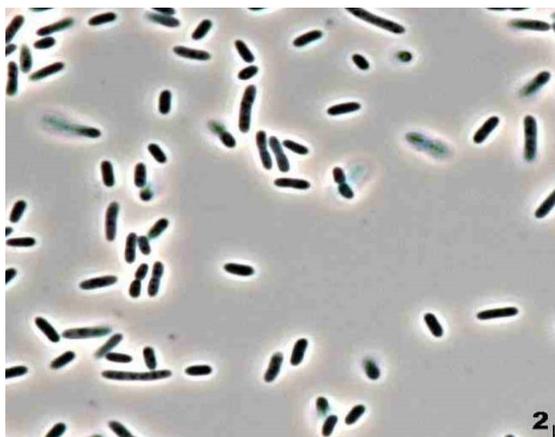


Slika 4. Lignja *Euprymna scolopes* s bakterijom *Vibrio fischeri*⁷⁷.

Bioluminiscencija je pojava koja nastaje kada živi organizam emitira vidljivo svjetlo. Ona je rezultat kemijske reakcije pri čemu se molekula luciferina oksidira odnosno reagira s kisikom i prelazi u oksiluciferin oslobađajući svjetlost dok brzinu reakcije određuje prisutnost enzima luciferaze.⁷⁸ Zanimanje za bioluminiscenciju *V. fischeri* i *Vibrio harveyi* dovelo je do otkrića autoindukcije ili „*quorum sensinga*“ kod Gram-negativnih bakterija 1970-ih godina.⁷⁹ Bioluminiscencijom bakterije uspostavljaju komunikaciju i ta je pojava nazvana *quorum sensing*. Pojavom je proizvodnja svjetla kontrolirana na način ovisan o gustoći stanica. Ukratko, tijekom ovog procesa bakterije proizvode malu molekulu (autoinduktor) koja se nakuplja u mediju. Kada molekula postigne odgovarajuću koncentraciju, inducira se ekspresija enzima luciferaze. Izvorno se smatralo da je otkrivanje *quoruma* proces jedinstven za bioluminiscentne bakterije. Međutim, pokazalo se da igra važnu ulogu u regulaciji različitih procesa u bakterijama uključujući stvaranje biofilma, patogenost, proizvodnju antibiotika i simbiozu. Svojstvo bioluminiscencije i međustanične komunikacije bakteriju čini pogodnom za provedbu ekotoksikoloških ispitivanja.⁷⁵ Tipičan oblik testa toksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri* podrazumijeva mjerenje intenziteta bioluminiscencije prije i nakon izlaganja ispitivanoj tvari. Suspendirana kultura bakterijskih stanica izlaže se rastućem nizu koncentracija ispitivanih tvari pri čemu su svi ostali parametri konstantni. Tijekom eksperimenta mjeri se intenzitet luminiscencije na početku, nakon 15 te nakon 30 minuta. Rezultat su vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ koje predstavljaju volumni udio te ih očitava instrument. Razrjeđenje uzorka može se napraviti prema dva niza, a to su geometrijski i linearni niz. Metoda se koristi za ispitivanje aerobne toksičnosti svih vrsta otpadnih voda te otopina toksičnih tvari.⁴⁸

2.6.2. Bakterija *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida je gram-negativna štapičasta bakterija koja ne fermentira i koja se sveprisutno susreće u okolišu (slika 5). Prosječna veličina bakterije je 2 – 4 μm .⁸⁰ Može se susresti u različitim ekološkim staništima. Ta je sveprisutnost povezana s izuzetno svestranim metabolizmom, prilagođenim da izdrži fizikalno-kemijski stres i sposobnošću da napreduje u teškim uvjetima. Zbog ovih karakteristika, postoji sve veći interes za ovu bakteriju za industrijsku upotrebu, a odgovarajuća istraživanja su posljednjih godina brzo napredovala. Potaknuto otkrićem potencijala *P. putida* u biorazgradnji ksenobiotika 1960-ih⁸⁰ stjecanje znanja o genetici, biokemiji i fiziologiji ovog mikroba kontinuirano napreduje tijekom posljednjih pet desetljeća.



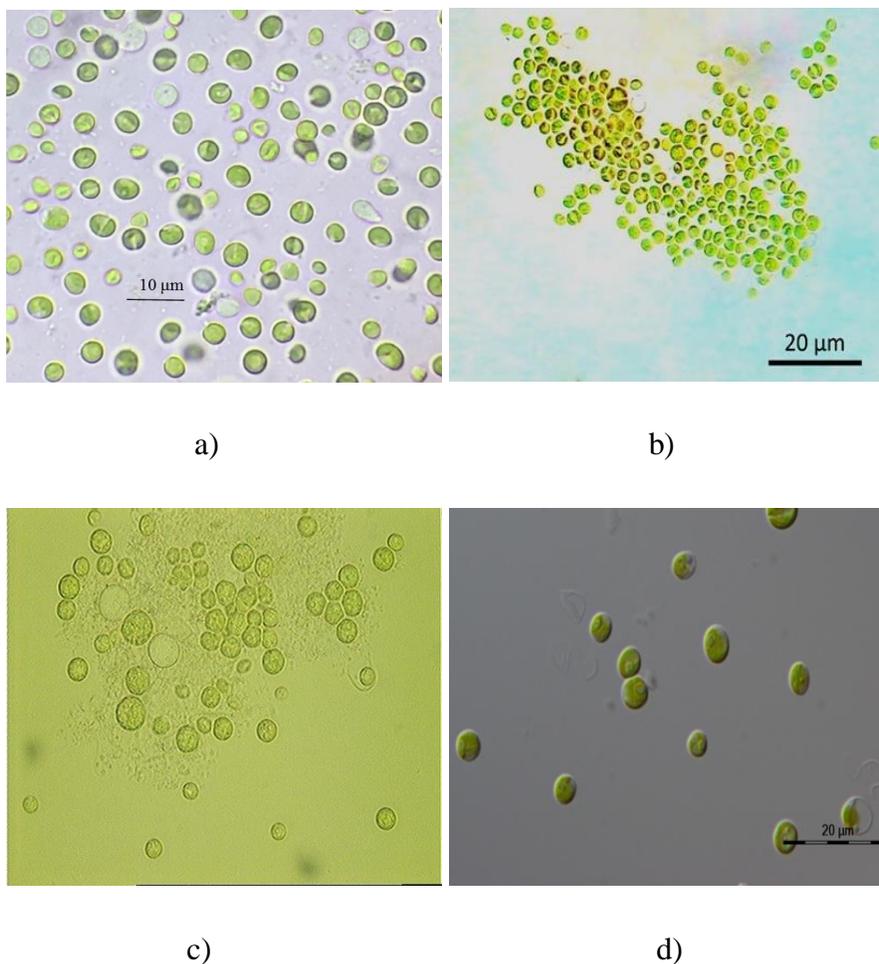
Slika 5. Mikrofografija bakterije *Pseudomonas putida*.⁸¹

Bakterija se kreće pomoću biča.⁸² Sadrži širok spektar metaboličkih enzima, omogućujući vrsti da se prilagodi različitim staništima, uključujući ona povezana s tlom i vodom.⁸³ *P. putida* je rijedak uzročnik infekcije kod ljudi.⁸⁴ Optimalna temperatura rasta bakterije je između 25 i 30 °C. Bakterija sudjeluje u bioremedijaciji voda i tla te bioakumulira teške metale.⁸⁵ Također svoju čestu primjenu pronalazi za određivanje toksičnosti ksenobiotika metodom inhibicije rasta (ISO 10712:1995).⁸⁶ Bakterije su uglavnom raspoređene pojedinačno ili u malim skupinama ili lancima. Rastu u strogim aerobnim uvjetima u uobičajenim supstratima, na kojima stvaraju nepravilno velike kolonije proizvodeći u vodi topljivi egzopigment koji difundira u atmosferu i boji je u žuto ili plavo-zeleno.⁸⁷ *Pseudomonas putida* primjenjuje se za određivanje toksičnosti ksenobiotika primjenom metode inhibicije rasta (ISO 10712:1995).⁸⁸ Ispitivanjem se utvrđuje inhibicijski učinak uzoraka otpadnih voda, površinskih voda i tvari topljivih u vodi prisutnih u ili

na tlu. Metoda se može koristiti i za procjenu ekotoksikoloških učinaka tla, osobito u nepoznatim mjestima, kompostu i otpadu no tada je potrebno pripremiti eluate.

2.6.3. Mikroalga *Chlorella* sp.

Jednostanične mikroalge roda *Chlorella* prisutne su u vodi, zraku i tlu (slika 6). S obzirom na fiziološke i morfološke promjene koje se javljaju kao odgovor na stanište, teško je identificirati rod mikroalgi. Razmnožavaju se nespolnim putem stvaranjem spora. *Chlorella* sp. je jednostavna, jednostanična vrsta zelenih algi kuglastog oblika.⁸⁹ Zbog sveprisutnosti u okolišu, jednostavnosti rada, svojstva obavljanja fotosinteze i brzog razmnožavanja često se koristi kao testni organizam u testovima toksičnosti kojima se ispituje utjecaj raznih ksenobiotika.⁹⁰



Slika 6. Vrste mikroalgi roda *Chlorella*: a) *Chlorella vulgaris*⁹¹, b) *Chlorella sorokiniana*⁹², c) *Chlorella minutissima*⁹³ d) *Chlorella variabilis*⁹⁴.

Test ekotoksičnosti primjenom mikroalgi provodi se na način da se eksponencijalno rastuće kulture mikroalgi izlažu različitim koncentracijama ispitivane toksične tvari pri određenim uvjetima i pri tome se određuje inhibicija rasta tijekom određenog vremena. Ukupni broj stanica mikroalgi određuje se brojanjem u Thominoj komorici koja se sastoji od predmetnice i pokrovnice te se poklapanjem predmetnice pokrovnicom zatvara točno određeni volumen koji je osnova za preračunavanje ukupno broja stanica na 1 mL. Testni uzorci sadrže ispitivanu tvar u odgovarajućim koncentracijama, bazalni medij te suspenziju mikroalgi početnog ukupnog broja živih stanica. Zatim se uzorci homogeniziraju pomoću rotacijske tresilice. Temperaturu je potrebno održavati u rasponu od 21 do 25 °C. Ukupni broj živih stanica mikroalge određuje se u 24., 48. i 72 satu nakon postavljanja eksperimenta.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Materijali

3.1.1.Fenoli

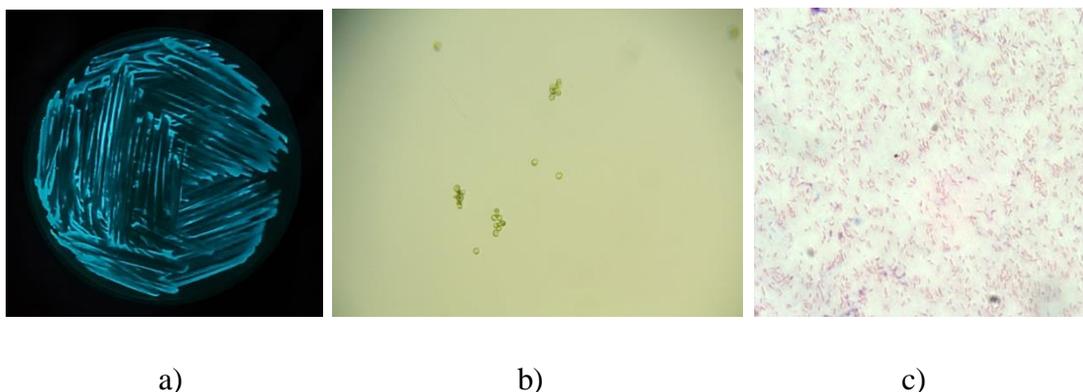
Za provedbu testova ekotoksičnosti pripremljena je temeljna otopina fenola koncentracije $\gamma_F=150$ mg/L. Iz temeljne otopine napravljene su radne otopine sljedećih koncentracija: 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L i 1 mg/L.



Slika 7. Koncentracije fenola korištene za provedbu testova ekotoksičnosti.

3.1.2. Testni mikroorganizmi

Za provedbu ispitivanja ekotoksičnosti fenola korišteni su sljedeći testni organizmi: morska bakterija *Vibrio fischeri*, mikroalga *Chlorella* sp. (slika 2.) i bakterijska kultura *Pseudomonas putida*. Navedene kulture pohranjene su u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju.



Slika 8. Testni mikroorganizmi: a) morska bakterija *Vibrio fischeri* b) mikroalga *Chlorella* sp. snimljena svjetlosnim mikroskopom opremljenim kamerom (P = 400x) c) bakterija *Pseudomonas putida*.

3.2. Mediji i kemikalije

3.2.1. Podloga za održavanje bakterije *Vibrio fischeri*

Čvrsta hranjiva podloga za uzgoj bakterije pripravljena je otapanjem sastojaka prikazanih u Tablici 3. Sastojci su se otapali u 1 L deionizirane vode, a nakon bubrenja agara, podloga se zagrijavala do vrenja. Prije upotrebe podloga se sterilizirala vlažnom sterilizacijom u autoklavu pri 1 atm, 121 °C tijekom 15 min. Kultura se uzgajala u Petrijevim zdjelicama pri temperaturi od 20 °C.

Tablica 3. Prikaz sastava čvrste hranjive podloge za uzgoj morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Tvar	m / g
NaCl	30,0
Glicerol	10,0
CaCO ₃	5,0
Pepton	5,0
Kvašćev ekstrakt	3,0
Agar	15,0

3.2.2. Otopina za resuspenziju

Hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri* pripravljena je otapanjem tvari navedenih u Tablici 4, u 1 litri deionizirane vode. Zatim se otopina prokuhala i ohladila. pH-vrijednost otopine je namještena u rasponu 6,8 - 7,2, što se postiglo dodavanjem 1 M NaOH ili HCl prema potrebi.

Tablica 4. Sastav otopine za resuspenziju morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Tvar	m / g
NaCl	20,0
KH ₂ PO ₄	0,2
CaCl ₂	0,5
MgSO ₄	0,2
Glukoza	10,0
Rafinoza	10,0
Glicerol	0,5 mL

3.2.3. Medij za uzgoj mikroalgi – bazalni medij

Za uzgoj mikroalge *Chlorella* sp., pripremljen je bazalni medij sastava prikazanog u Tablici 5 (po 1 L), čija je pH-vrijednost bila podešena na 8,023.

Tablica 5. Prikaz sastava bazalnoga medija za uzgoj mikroalgi *Chlorella* sp.

Tvar	m / 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

3.2.4. Mineralni medij

Mineralni medij koristio se za pripremu suspenzije bakterijske kulture *Pseudomonas putida*. Pripremao se prema uputama ISO 1072:1995.⁹⁵ Spojevi, prikazani u tablici 6, pripremali su se u 1 L deionizirane vode. pH – vrijednost mineralnog medija podesila se na 7,019 pomoću 1 M NaOH, te je mineralni medij prije upotrebe steriliziran.

Tablica 6. Sastav mineralnog medija za provedbu testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

Tvar	m / g
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	0,12
KH ₂ PO ₄	0,06
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
C ₆ H ₅ FeO ₇	5*10 ⁻⁴

3.2.5. Hranjivi agar

Hranjivi agar korišten je za uzgoj bakterijske kulture *Pseudomonas putida*. Hranjivi agar pripremljen je otapanjem 18 g već gotove hranjive podloge u mineralnom mediju. pH vrijednost podloge iznosila je 7,3.

3.3. Mjerni instrumenti i oprema

Za provedbu i praćenje testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri* korišteni su sljedeći uređaji:

- Mjerni uređaj LUMISTox 300 u kombinaciji s inkubacijskim blokom LUMIStherm, Dr. Lang mjerenje luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri*
- Termostat INKO, Zagreb, Hrvatska - uzgajanje bakterijske kulture *Vibrio fischeri*
- poluautomatske pipete - za pripremu razrjeđenja



a)

b)

Slika 9. Mjerni instrumenti: a) Luminometar LUMISTox 300, b) termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH

Za provedbu testa ekotoksičnosti primjenom *Chlorella* sp. korišteni su sljedeći mjerni instrumenti i oprema:

- Erlenmeyerove tikvice ukupnog volumena 100 mL
- Aeracijska pumpa Tetrattec u svrhu aeriranja alge te za osvjetljenje alge koristila lampa
- Svjetlosni mikroskop (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljen kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera)

- Thomina komorica u svrhu određivanja ukupnog broja živih stanica mikroalgi (CFU)
- pH elektroda SenTix® 940
- kisikova elektroda FDO® 925 za mjerenje koncentracije otopljenoga kisika pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i
- elektroda za vodljivost
- rotacijska tresilica Heidolph unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka

Za provedbu testa ekotoksičnosti primjenom *Pseudomonas putide* korišteni su sljedeći mjerni instrumenti i oprema:

- termostat Termomedicinski aparati, Hrvatska za uzgoj bakterijske kulture
- pH-elektroda SenTix® 940, kisikova elektroda FDO® 925
- spektrofotometar Hach, Model DR/2400, SAD za određivanje optičke gustoće
- homogenizator EV-100, Tehnica, Slovenija za homogeniziranje priređenih decimalnih razrjeđenja
- svjetlosni mikroskop (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljen kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

Autoklav Sutjeska, Jugoslavija korišten je za sterilizaciju bazalnog i mineralnog medija, hranjive podloge, čistog staklenog posuđa te onečišćenog posuđa.

3.4. Metode rada

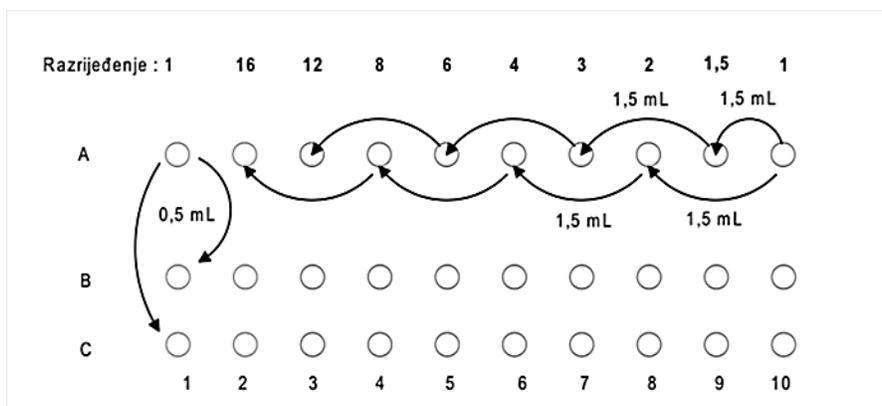
3.4.1. Test ekotoksičnosti primjenom *Vibrio fischeri*

Određivanje ekotoksičnosti fenola provodilo se primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* praćenjem inhibicije fiziološkog svojstva bioluminiscencije. Provedba eksperimentalnog dijela rada uključivala je precjepljivanje na čvrstu hranjivu podlogu i inkubaciju na 20 °C, 24-48 h. Prije početka provođenja ispitivanja bilo je potrebno podesiti pH-vrijednost uzorka između 6 i 8,5 pomoću 1 M NaOH ili HCl. Resuspenzija bakterije provedena je na način da se ušicom eze zahvatila čista kulture povlačenjem u duljini oko 1 cm te ju se resuspendiralo u epruveti sa čepom koja je do 2/3 napunjena otopinom za resuspenziju. Nakon toga, epruveta sa čepom

stajala je pola sata u termostatu pri 15 °C, kako bi se bakterijska kultura aktivirala. U radu je najprije mjerena luminiscencija bakterijskih suspenzija bez čistih aktivnih supstanci spojeva, a potom se sljedeći pravilo linearnog ili geometrijskog niza dodavala otopina fenola ispitivanih koncentracija. Prije provođenja testa ekotoksičnosti potrebno je provjeriti početnu luminiscenciju pripremljene bakterijske suspenzije, pri čemu ona treba iznositi minimalno 1000 da bi test mogao započeti. Test ekotoksičnosti proveden je prema linearnom i geometrijskom nizu.

Postupak provedbe testa ekotoksičnosti prema linearnom nizu:

1. U prvu kivetu stavilo se 2/3 kivete 2 %-tne otopina NaCl, u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta, koliko smo utvrdili u screeningu. U predzadnju kivetu stavilo se 1 mL 2 %-tne otopine NaCl, a u sve ostale kivete stavilo se po 1,5 mL 2 %-tne otopine NaCl.
2. U A nizu napravio se niz željenih razrjeđenja na način koji je prikazan na Slici 4.
3. U sve ostale kivete B i C niza stavilo se po 0,5 mL inokuluma.

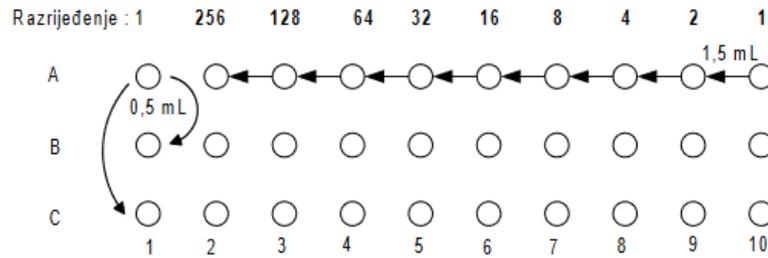


Slika 10. Shematski prikaz pripreme razrjeđenja ispitivane tvari prema linearnom nizu.

Postupak provedbe testa ekotoksičnosti prema geometrijskom nizu:

1. U prvu kivetu stavilo se 2/3 kivete 2 %-tne otopina NaCl, u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta, koliko smo utvrdili u screeningu.

- U A nizu napravio se niz željenih razrjeđenja počevši od najmanjeg do najvećeg, tako da se po 1,5 mL dobro homogeniziranog uzorka prebacio iz kivete u kivetu (slika 5).
- U sve ostale kivete B i C niza stavilo se po 0,5 mL inokuluma.



Slika 11. Shematski prikaz pripreme razrjeđenja ispitivane tvari prema geometrijskom nizu.

Test se provodio tijekom 30 minuta pri čemu je mjerena luminiscencija za kontrolu i za svako pripremljeno razrjeđenje. Nakon završetka testa izračunata je inhibicija prema formuli :

$$\text{INH} = \frac{\text{Lu}_{\text{kontrola}} - \text{Lu}_{\text{uzorak}}}{\text{Lu}_{\text{kontrola}}} * 100$$

pri čemu je INH inhibicija (%), $\text{Lu}_{\text{kontrola}}$ intenzitet bioluminiscencije kontrolnog uzorka nakon 30 minuta, dok je $\text{Lu}_{\text{uzorak}}$ intenzitet bioluminiscencije uzorka s ispitivanim fenolom nakon 30 minuta.

3.4.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp. provodio se u Erlenmeyerovim tikvicama u koje je dodano sljedeće:

- otopina fenola u odgovarajućim koncentracijama
- bazalni medij, čija je pH-vrijednost iznosila 8,023 te
- suspenzija mikroalge, čiji je početni CFU određen na početku eksperimenta brojanjem živih stanica mikroalgi u Thominoj komorici i iznosio je $3,6 * 10^5$ st/mL.

Radni volumen iznosio je 25 mL. Pripremljena je i slijepa proba koja sadrži suspenziju mikroalge i bazalni medij. Na početku testa izmjereni su početni uvjeti odnosno pH-vrijednost, temperatura, koncentracija otopljenog kisika te vodljivost prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Početni uvjeti testa ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Početni uvjeti pokusa					
OG ₀ sr.	CFU ₀ / st/mL	logCFU ₀ / -	pH ₀ / -	γ ₀ (O ₂) / mg/L	T ₀ / °C
0,018	3,6*10 ⁵	5,5563	8,189	7,87	24,4

Pripremljene tikvice stavljene su na rotacijsku tresilicu pri 160 o/min pri 25 ± 2 °C (Slika 12). Test se provodio tijekom 72 sata, ali nakon svaka 24 sata se određivao CFU.



Slika 12. Prikaz tikvica na rotacijskoj tresilici tijekom provedbe pokusa testa ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Određivanje ukupnog broja stanica mikroalgi provodilo se brojanjem u Thominoj komorici. Thomina komorica je predmetnica koja se razlikuju od onih koje se koriste za pripravu nativnih preparata. U sredini se nalazi mreža od 16 kvadrata od kojih je svaki podijeljen u 25 malih

kvadrata. Ukupno ima 400 kvadrata pa ukupna površina iznosi 1 mm². Poklapanjem predmetnice pokrovnicom zatvara se točno određeni volumen tekućine koji predstavlja osnovu za preračunavanje ukupnog broja stanica na 1 mL. Komorica se stavila na stolić mikroskopa te se pri povećanju od 10x mikroskopiralo, dok se u vidnom polju nije vidjela cijela mrežica (16 veliki kvadrata). Pod povećanjem objektiva od 40x pogledao se jedan manji kvadrat. Pipetom se nanijela kapljica dobro homogenizirane suspenzije mikroalge na sredinu Thomine komorice i poklopilo se pokrovnicom. Priređeni preparat stavio se na stolić mikroskopa i brojale su se stanice mikroalgi u 3 velika kvadrata za svaku tikvicu.

Ukupni broj stanica mikroalgi u 1 mL izračunava se prema:

$$N = m * n * 16 * 10^4 / K$$

pri čemu je N - ukupan broj stanica u 1 mL, m - ukupan broj pobrojanih stanica, n - razrjeđenje, 16 - ukupan broj velikih kvadrata, 10^4 - korekcija volumena, K - broj velikih kvadrata u kojima je izvršeno brojanje.

Postotak inhibicije rasta mikroalgi pri svakoj koncentraciji ispitivane tvari (I_A) izračunava se kao razlika vrijednosti ukupnog broja živih stanica (CFU) između kontrole i uzoraka prema formuli:

$$I_A = \frac{CFU (kontrola) - CFU (uzorak)}{CFU (kontrola)} * 100$$

pri čemu je I_A inhibicija rasta mikroalgi, CFU (kontrola) vrijednost živih stanica mikroalgi za kontrolu te CFU (uzorak) vrijednost ukupnog broja živih stanica mikroalgi za uzorak. Vrijednost inhibicije prikazuje se u odnosu na koncentracije ispitivanih tvari.

3.4.3. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Određivanje ekotoksičnosti fenola primjenom bakterije *Pseudomonas putida* provodilo se na termostatiranoj rotacijskoj tresilici pri 25±2 °C, 160 o/min i 72 h u tikvicama volumena 100 mL, odnosno radnog volumena 50 mL. Prije postavljanja pokusa bilo je potrebno uzgojiti bakterijsku kulturu. *Pseudomonas putida* uzgojena je na čvrstoj hranjivoj podlozi (hranjivom agaru; HA) u Petrijevim zdjelicama pri 37 °C i 24 h. Bakterijska kultura koja je precijepljena 24 h prije

postavljanja pokusa koristila se za preduzgoj kulture *P. putida*. Preduzgoj se provodio u mineralnom mediju tijekom $5 \pm 0,5$ h prije postavljanja pokusa, prema metodi ISO 10712:1995.⁹⁵ Od uzgojene kulture priređena je suspenzija čija je početna optička gustoća u mineralnom mediju iznosila 0,26 pri valnoj duljini $\lambda = 436$ nm. Tikvice su sadržavale bakterijsku suspenziju te određene volumne temeljne otopine fenola u mineralnom mediju. Za svaki pokus bila je postavljena i slijepa proba koja nije sadržavala fenole. Mjerenja su se provodila tijekom 3 dana svakih 24 sata. Prije početka izvođenja testa, odredili su se početni uvjeti pokusa prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Početni uvjeti testa ekotoskičnosti za fenole primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

Početni uvjeti pokusa					
OG ₀ sr.	CFU ₀ / st/mL	logCFU ₀ / -	pH ₀ / -	$\gamma_0(\text{O}_2)$ / mg/L	T_0 / °C
0,26	$1,9 \cdot 10^8$	8,2788	7,619	7,7	26,7

Tijekom tri dana, svakih 24 sata, po 1 mL suspenzije izuzeo se iz Erlenmeyerovih tikvica s uzorcima te se dodao u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Uzorak se homogenizirao te se 1 mL uzorka izuzeo iz te epruvete i dodao u novu koja je također sadržavala 9 mL sterilne fiziološke otopine. Postupak se ponavljao još četiri puta kako bi se dobio niz razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-6} . Zatim se po 1 mL suspenzija razrjeđenja 10^{-5} i 10^{-6} izuzeo te otpipetirao na Petrijeve zdjelice sterilnom tehnikom rada. Uzorci su se zalili hranjivom podlogom te homogenizirali. Petrijeve zdjelice stavljene su u termostat na inkubaciju tijekom 24 - 48 h na 37 °C. Nakon uzgoja bakterija, brojale su se izrasle bakterijske kolonije na hranjivoj podlozi. Brojale su se Petrijeve zdjelice koje su sadržavale 30 do 300 kolonija. CFU (engl. *Colony Forming Units*) vrijednost odredila se pomoću formule:

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

Na temelju CFU vrijednosti izračunata je inhibicija rasta bakterije prema formuli :

$$\text{INH} = \frac{\text{CFU}_{\text{kontrola}} - \text{CFU}_{\text{uzorak}}}{\text{CFU}_{\text{kontrola}}} * 100$$

pri čemu je $\text{CFU}_{\text{kontrola}}$ ukupan broj živih bakterijskih stanica u kontrolnoj tikvici, a $\text{CFU}_{\text{uzorak}}$ ukupan broj živih bakterijskih stanica u uzorku.

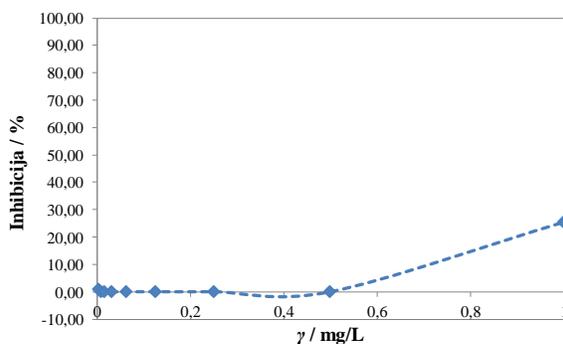
4.REZULTATI

4.1.Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri*

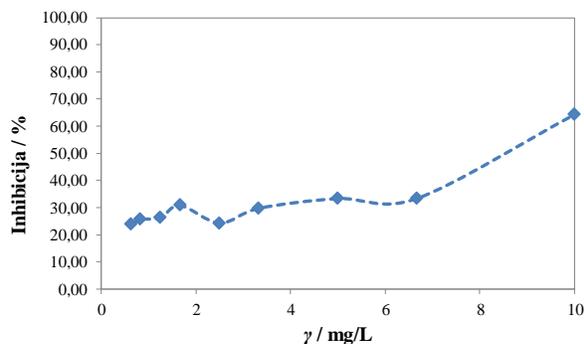
Test ekotoksičnosti fenola proveden je na otopinama fenola različitih koncentracija navedenih u poglavlju 3.1.3. Rezultati su prikazani u Tablici 9 te grafički (slika 13.).

Tablica 9. Dobivene EC vrijednosti za pojedine ispitivane koncentracije fenola.

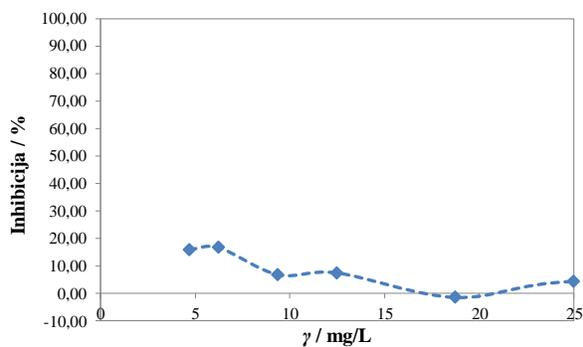
γ_F / mg/L	EC ₂₀ / mg/L	EC ₅₀ / mg/L
1	-	-
10	-	0,93
25	0,80	-
50	10,38	55,70
75	3,38	28,06
100	1,32	25,00



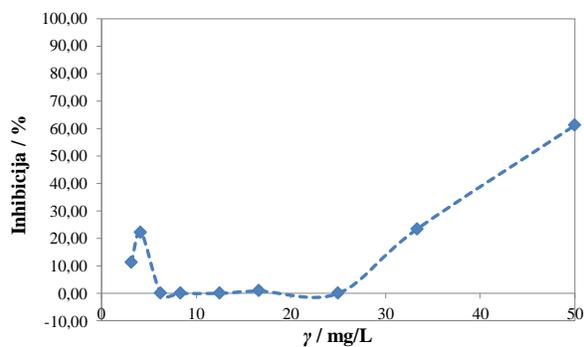
a)



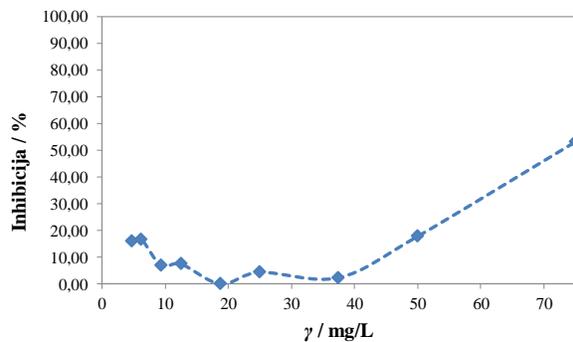
b)



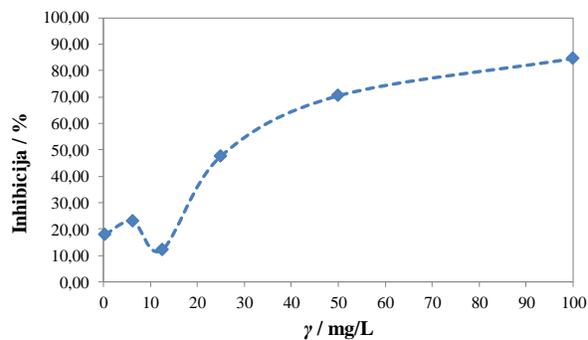
c)



d)



e)

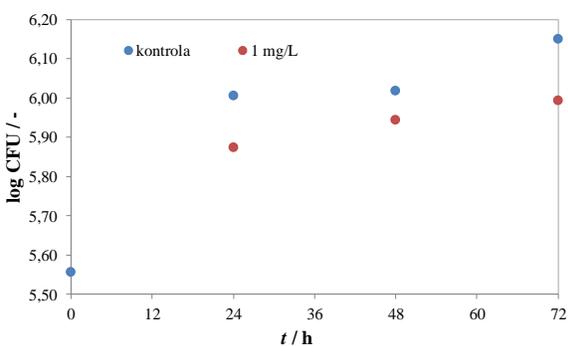


f)

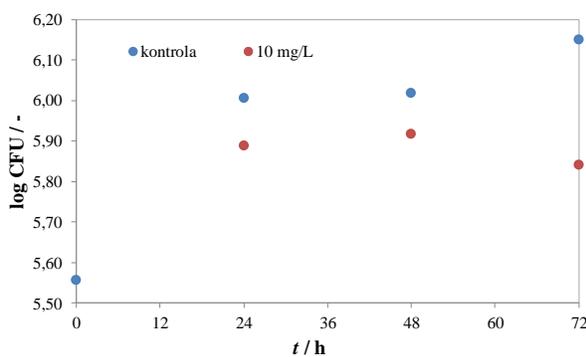
Slika 13. Inhibicija (%) bioluminiscentije bakterije *Vibrio fischeri* tijekom izloženosti različitim koncentracijama fenola, γ_F : a) $\gamma_F = 1$ mg/L, b) $\gamma_F = 10$ mg/L, c) $\gamma_F = 25$ mg/L i d) $\gamma_F = 50$ mg/L, e) $\gamma_F = 75$ mg/L i f) $\gamma_F = 100$ mg/L.

4.2. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

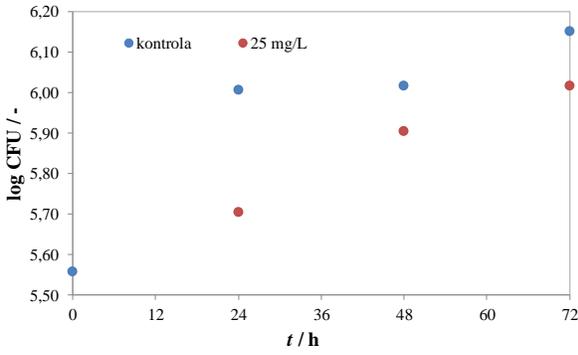
Provođenjem testa ekotoksičnosti fenola primjenom mikroalge *Chlorella* sp. praćen je ukupni broj živih stanica (CFU) na temelju kojeg je izračunata inhibicija. Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slikama 14-16. Eksperimentalno dobivena koncentracija tvari koja je smrtonosna za 50 % istraživanih jedinki u testu ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp. iznosi $EC_{50} = 86,98$ mg/L.



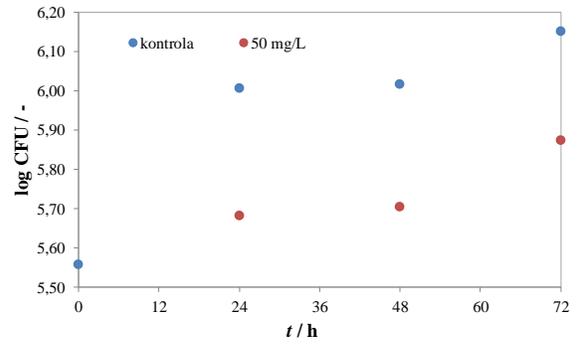
a)



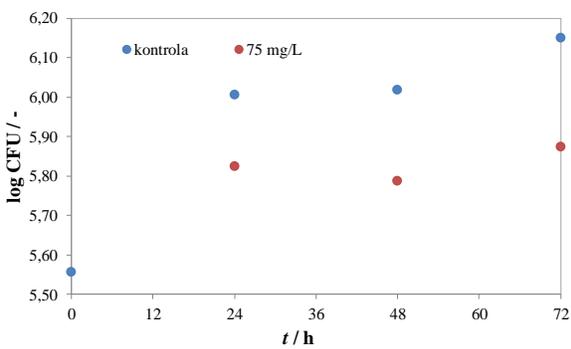
b)



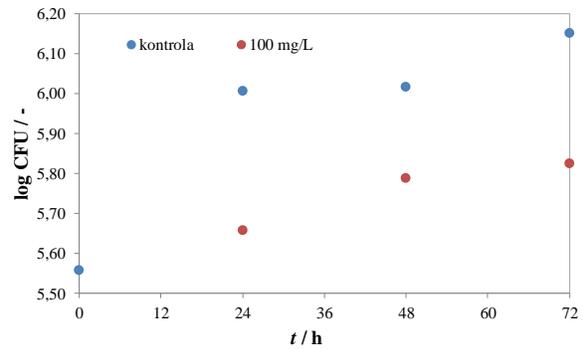
c)



d)

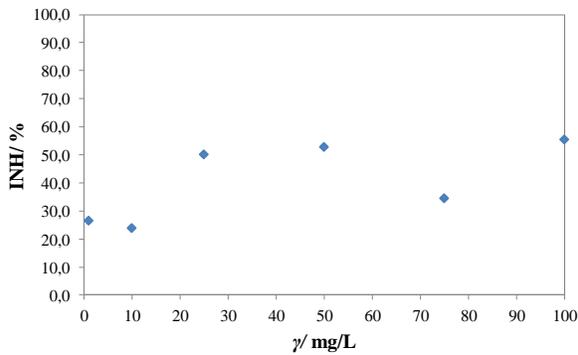


e)

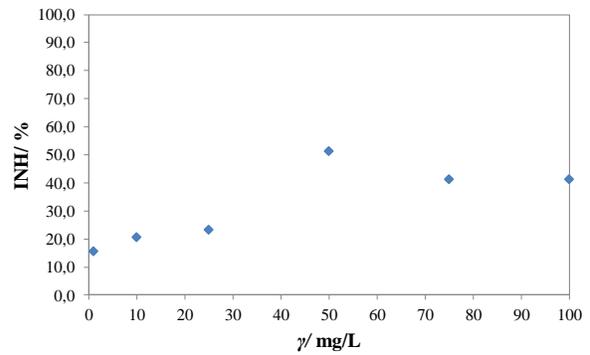


f)

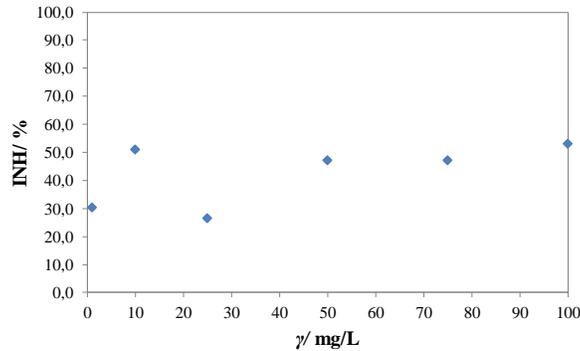
Slika 14. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. izložene različitim koncentracijama fenola, γ_F , tijekom 24, 48 i 72 h u odnosu na kontrolu : a) $\gamma_F = 1$ mg/L, b) $\gamma_F = 10$ mg/L, c) $\gamma_F = 25$ mg/L i d) $\gamma_F = 50$ mg/L, e) $\gamma_F = 75$ mg/L i f) $\gamma_F = 100$ mg/L.



a)

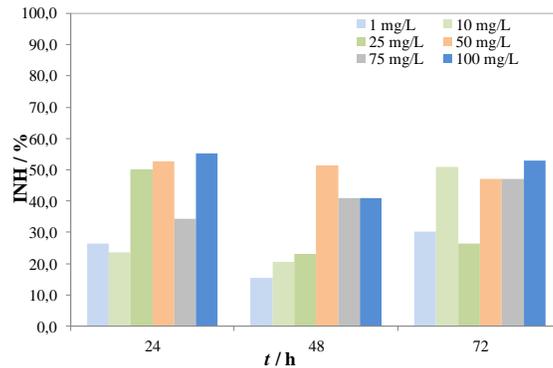


b)



c)

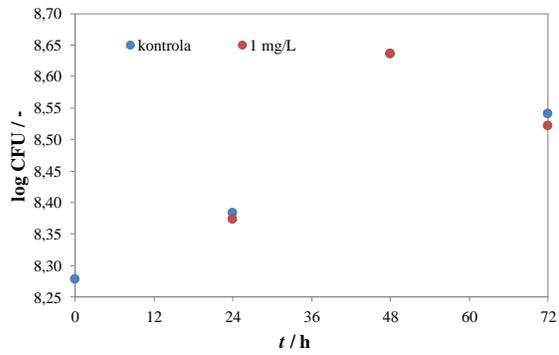
Slika 15. Inhibicija (%) mikroalge *Chlorella* sp. izložene različitim koncentracijama fenola tijekom određenog vremena: a) nakon 24 h, b) nakon 48 h i c) nakon 72 h.



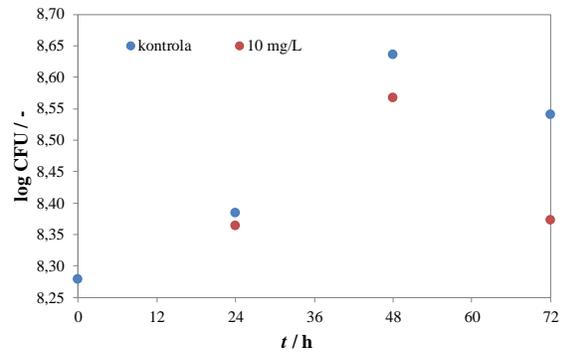
Slika 16. Inhibicija (%) mikroalge nakon 72 sata izloženosti različitim koncentracijama fenola.

4.3. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

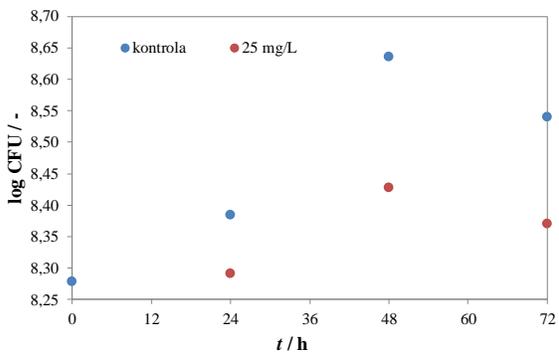
Postupkom opisanim u poglavlju 3.4.3. uzgojena je bakterijska kultura *Pseudomonas putida* koja se koristila za kao testni organizam za testove ekotoksičnosti. Tijekom eksperimenta pratila se promjena broja živih stanica CFU te je na temelju tih vrijednosti izračunata inhibicije prema formuli navedenoj u poglavlju 3.4.3. Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slikama 17 – 19. Eksperimentalno dobivena koncentracija tvari koja je smrtonosna za 20 % istraživanih jedinki u testu ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* iznosi $EC_{20}=29,80$ mg/L.



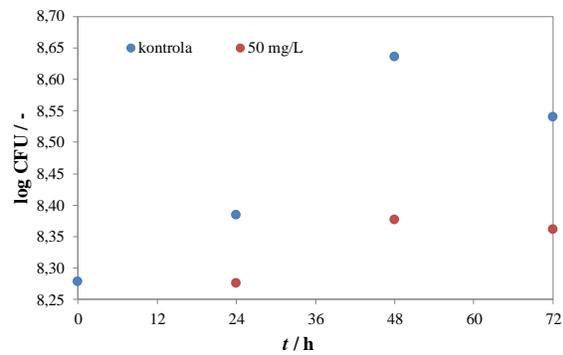
a)



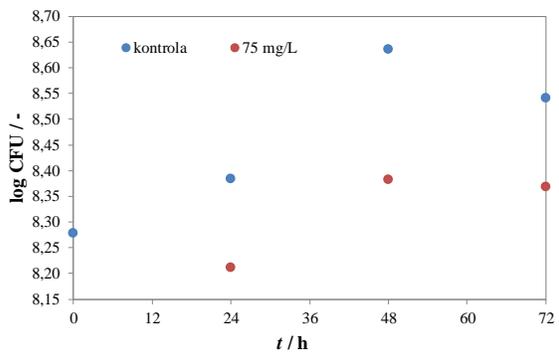
b)



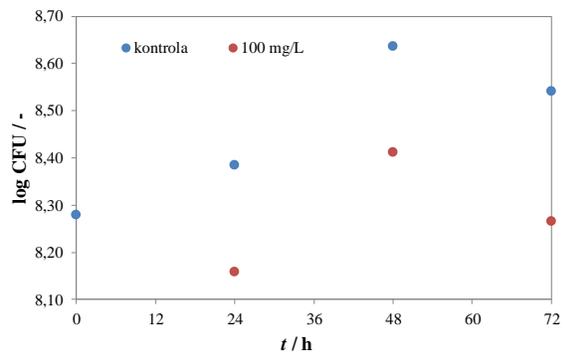
c)



d)

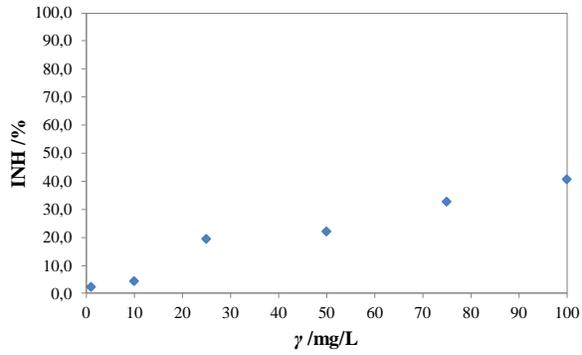


e)

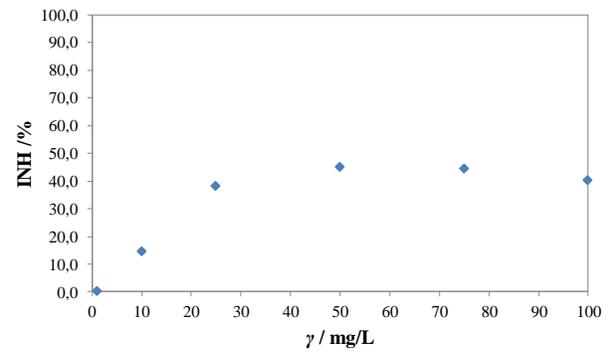


f)

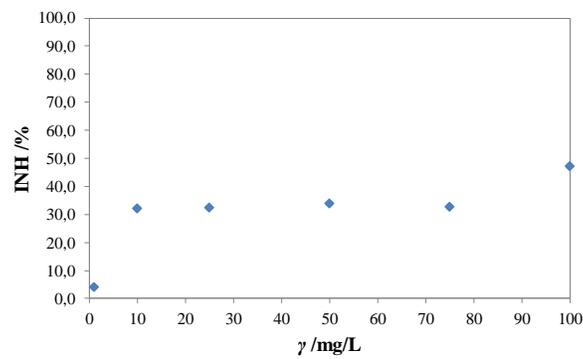
Slika 17. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* izložene različitim koncentracijama fenola, γ_F , tijekom 24, 48 i 72 h u odnosu na kontrolu : a) $\gamma_F = 1$ mg/L, b) $\gamma_F = 10$ mg/L, c) $\gamma_F = 25$ mg/L i d) $\gamma_F = 50$ mg/L, e) $\gamma_F = 75$ mg/L i f) $\gamma_F = 100$ mg/L.



a)

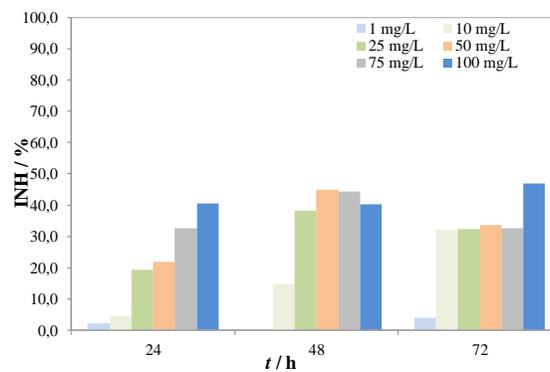


b)



c)

Slika 18. Inhibicija (%) bakterije *Pseudomonas putida* izložene različitim koncentracijama fenola tijekom određenog vremena : a) nakon 24 h, b) nakon 48 h i c) nakon 72 h.



Slika 19. Inhibicija (%) bakterije nakon 72 sata izloženosti različitim koncentracijama fenola.

5.RASPRAVA

Ljudske aktivnosti dosegle su razinu na kojoj je njihov utjecaj na okoliš globalan. Atmosfera, biosfera i hidrosfera poremećeni su na način koji može biti nepovratan, uglavnom kao rezultat brzog rasta svjetske populacije i industrija. Fenoli i njihovi spojevi, zbog svoje široke upotrebe, imaju veliki utjecaj na ravnotežu vodenih ekosustava te ljudsko zdravlje. U novijim studijama istraženi su učinci fenolnih spojeva sadržanih u otpadnoj vodi na vodene organizme. Fenolni spojevi djeluju kao inhibitori rasta vodenih bioloških sustava posebno potiskujući rast različitih vrsta mikroalgi.¹ U ovome radu ispitan je utjecaj fenola na različite organizme. Provedeni su pokusi ispitivanja ekotoksičnosti fenola na morsku bakteriju *Vibrio fischeri*, bakteriju *Pseudomonas putida* te slatkovodnu algu *Chlorella* sp. Postupak provedbe te praćeni parametri opisani su u poglavlju 3.

5.1. Ispitivanje ekotoksičnosti fenola primjenom *Vibrio fischeri*

Provedbom testa ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* mjerena je inhibicija svojstva bioluminiscencije. Rezultati su prikazani tablično i grafički. Vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ prikazane u Tablici 9. dobivene su pomoću luminometra nakon provedbe testa ekotoksičnosti te ukoliko nisu dobivene pomoću uređaja, procjenjivale su se grafički. Test se provodio prema normi⁹⁶ pri čemu luminometar računa EC_x vrijednosti. Računanje EC_x vrijednosti temelji se na logaritamskoj linearnosti inhibicije i koncentracije. Dobivene vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ niže su za ispitivane veće koncentracije, odnosno za ispitivanu koncentraciju fenola od 50 mg/L EC₂₀ vrijednost iznosi 10,38, dok je za koncentraciju fenola od 100 mg/L vrijednost EC₂₀ iznosila 1,32. Promatrajući ispitivane koncentracije fenola, uočava se trend smanjenja EC vrijednosti porastom koncentracija. Taj se trend najviše vidi kod koncentracija fenola od 50 do 100 mg/L, što ukazuje na najveću toksičnost za najvišu ispitivanu koncentraciju. Kod koncentracije od 1 mg/L uočen je najmanji toksični utjecaj jer su inhibicije bioluminiscencije bakterije bile negativne, što pokazuje na preveliko razrjeđenje ispitivane tvari i pri toj koncentraciji ispitivana tvar nema negativan utjecaj na *Vibrio fischeri*. Testom toksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* ispitivano je 6 različitih koncentracija fenola te su one razrjeđene prema linearnom ili geometrijskom nizu. Promjenom koncentracije fenola dolazi do promjene inhibicije svojstva bioluminiscencije, odnosno povećanjem koncentracije fenola dolazi do smanjenja bioluminiscencije. Na grafovima na slici 13. mogu se primijetiti određena odstupanja nastala

uslijed eksperimentalne pogreške, a prikazane su ovisnosti inhibicije (%) bioluminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* tijekom izloženosti različitim koncentracijama fenola, odnosno krivulje doza – odgovor. Na temelju grafova može se zaključiti da povećanjem koncentracije fenola dolazi do inhibicije svojstva bioluminiscencije. U istraživanju koje su proveli Aruoja i sur.⁶² eksperimentalno dobivene vrijednosti EC₅₀ za *V. fischeri* kretale su se od 0,37 mg/L (2,3,5-triklorofenol) do 491 mg/L (anilin). Uspoređujući rezultate možemo zaključiti da što je niža EC_x vrijednost, veći je toksični utjecaj ispitivane tvari na bioluminiscenciju bakterije. Također i rezultati istraživanja koje su proveli Guerra i sur.⁵⁹ potvrđuju visoku osjetljivost *Vibrio fischeri* na fenole.

5.2. Ispitivanje ekotoksičnosti fenola primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Provedbom testa ekotoksičnosti primjenom slatkovodne alge *Chlorella* sp. praćen je ukupan broj živih stanica mikroalge tijekom 72 sata. U ovome pokusu, *Chlorella* sp. izlagala se različitim koncentracijama fenola tijekom 72 h, a početni uvjeti prikazani su u Tablici 7. Tijekom ekperimenta nisu zabilježene promjene boje ni oblika stanica mikroalge. Tijekom pokusa nije došlo do značajne promjene pH vrijednosti. Na slici 8 prikazana je promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. izložene različitim koncentracijama fenola, γ_F , tijekom 24, 48 i 72 h u odnosu na kontrolu. Kontrolni uzorak pokazuje da broj kolonija blago raste tijekom 72 h. Uspoređujući ispitivane koncentracije fenola od 1, 25, 50 i 100 mg/L s kontrolnim uzorkom vidljivo je da logaritamska vrijednost broja živih stanica mikroalge raste tijekom 72 h, dok je za koncentraciju fenola od 10 mg/L vidljivo da nakon 72 h dolazi do pada logCFU. Taj je pad vrijednosti moguće objasniti efektom hormeze.⁹⁴ Sličan trend promjene log CFU pokazuje i uzorak koncentracije fenola od 75 mg/L pri čemu dolazi do rasta logCFU, zatim vrijednost opada te nakon 48 h ponovno raste. Varijacije logCFU vrijednosti moguće je objasniti i mogućnošću prilagodbe mikroorganizama na toksične tvari. Na temelju dobivenih vrijednosti CFU, izračunate su inhibicije za svaku ispitivanu koncentraciju fenola. Rezultati su prikazani grafički na slikama 15 i 16. Rezultati promjene inhibicije rasta u odnosu na ispitivane koncentracije fenola prikazani su na dvije vrste grafikona, raspršenom i stupčastom. Na temelju grafova vidljivo je da povećanjem koncentracije ispitivane tvari dolazdo povećanja inhibicije, no također tijekom 72h nije došlo do značajnih promjena inhibicije rasta mikroalge u odnosu na inhibiciju nakon 24 ili

48h,. Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima istraživanja koje su proveli Aruoja i sur.⁶² ispitujući 58 supstituiranih anilina i fenola pomoću testa inhibicije rasta mikroalgi s *Pseudokirchneriella subcapitata* pri čemu je samo pet od 58 ispitanih kemikalija pokazalo je inhibicijski učinak na mikroalge u koncentracijama >100 mg/L i u ovom je ispitivanju najveća inhibicija kod koncentracije fenola od 100 mg/L i iznosi oko 50 %. Ovaj rezultat potvrđuje i istraživanje koje su proveli Gomaa i sur.⁶⁸ pri čemu je efektivna koncentracija fenola koja može uzrokovati 50 % inhibiciju (EC₅₀) na stanicama *Chlorella* sp. bila iznad 1000 mg/L jer vrijednosti inhibicije nisu prelazile 50 % za ispitivane koncentracije fenola od 200 – 1000 mg/L.

5.2. Ispitivanje ekotoksičnosti fenola primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Provedbom testa ekotoksičnosti fenola primjenom bakterije *P. putida* tijekom 72 sata određivan je ukupan broj živih stanica bakterije, CFU. Rezultati uzorka uspoređivani su s rezultatima kontrole koja nije sadržavala fenole. Kontrolni uzorak pokazuje rast broja kolonija, no nakon 48 sata provođenja testa broj kolonija počinje opadati. Uspoređujući ispitivane koncentracije fenola s kontrolnim uzorkom, može se primijetiti jednaki trend. Vidljivo je da od početka testa broj kolonija prati trend rasta tijekom 48h, te nakon toga, logCFU pada. Vrijednosti inhibicije za svaku ispitivanu koncentraciju fenola izračunate su na temelju dobivenih CFU vrijednosti. Rezultati su prikazani na slikama 18 i 19. Vidljiv je trend blagog rasta inhibicije s porastom koncentracije fenola. Maksimalna inhibicija od 46,97 % postignuta je nakon 72 h izlaganja za koncentraciju fenola od 100 mg/L. Koncentracije fenola od 1 i 10 mg/L nisu pokazale značajan ekotoksični učinak fenola. Uspoređujući s s rezultatima ispitivanja koje su proveli Heipieper i sur.¹⁰¹ te Weber i sur.¹⁰² rezultati ovog istraživanja pokazuju da fenoli nemaju veliki ekotoksičan učinak na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* pri koncentraciji <100 mg/L. Rezultati su u skladu s literaturom jer se *Pseudomonas* sp. smatra glavnim organizmom koji može iskoristiti fenol kao izvor ugljika, što objašnjava smanjen ekotoksičan utjecaj fenola na ovu bakteriju.⁹²

6.ZAKLJUČAK

Provedbom testova ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*, mikroalge *Chlorella* sp. te bakterije *Pseudomonas putida* ispitana je toksičnost fenola. Cilj istraživanja bio je utvrditi inhibiciju rasta mikroalge *Chlorella* sp. i bakterije *Pseudomonas putida* te smanjenje bioluminiscencije morske bakterije *Vibrio fischeri* tijekom izlaganja fenolima. Postotak inhibicije rasta mikroalge *Chlorella* sp. nakon 72 sata bio je 55,26 %, dok je inhibicija rasta *Pseudomonas putida* bila 46,97 %. Maksimalna inhibicija postignuta primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* iznosila je 84,52 % te možemo zaključiti da je *Vibrio fischeri* u ovom istraživanju najosjetljiviji mikroorganizam na ispitivane koncentracije fenola. Negativna odnosno niža inhibicija prisutna kod nižih koncentracija fenola ukazuje da se razrjeđenjem smanjuje ekotoksičan utjecaj fenola na vodene organizme. Kod *Pseudomonas putide* postignuta je najmanja inhibicija za fenole u usporedbi s ostalim testovima ekotoksičnosti pa možemo zaključiti da je prema ovome istraživanju *Pseudomonas putida* najmanje osjetljiva na ispitivane koncentracije fenola.

7. POPIS KRATICA I SIMBOLA

CFU - engl. Colony Forming Units; jedinice koje tvore kolonije

PAH - policiklički aromatski ugljikovodici

BHT - butilirani hidroksitoluen

ISO - engl. International Standardisation Organisation; Internacionalna organizacija za standardizaciju

OECD - engl. Organisation for Economic Colaboration and Development; organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj

LC₅₀ - letalna koncentracija za 50% populacije

EC₅₀ - efektivna koncentracija za 50% populacije

IC₅₀ – inhibitorna koncentracija za 50% populacije

EC₂₀ – efektivna koncentracija za 20% populacije

γ_F - masena koncentracija fenola, mg/L

m – masa, g

INH – inhibicija, %

Lu_{kontrola} - intenzitet bioluminiscencije kontrolnog uzorka nakon 30 minuta

Lu_{uzorak} - intenzitet bioluminiscencije uzorka s ispitivanim fenolom nakon 30 minuta

OG_{0sr.} – srednja vrijednost početne optičke gustoće

CFU_{0sr.} – srednja vrijednost jedinica koje tvore kolonije u početnim uvjetima, st/mL

pH₀ – početna pH vrijednost

$\gamma_0(O_2)$ – masena koncentracija kisika, mg/L

T₀ – temperatura, °C

K - broj velikih kvadrata u Thominoj komorici u kojima je izvršeno brojanje

I_A - inhibicija rasta mikroalgi, %

HA – hranjivi agar

λ – valna duljina, nm

CFU_{kontrola} - ukupan broj živih bakterijskih stanica u kontrolnoj tikvici

CFU_{uzorak} - ukupan broj živih bakterijskih stanica u uzorku

8. LITERATURA

- [1] Ahmed, J., Thakur, A., Goyal, A., Biological Treatment of Industrial Wastewater, ed. M. P. Shah, The Royal Society of Chemistry, 2021, pp. 1-14.
- [2] Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K.-H., & Yang, J. (2018). *Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi:10.1016/j.jiec.2018.11.024
- [3] Gami, A. A., *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 2 (2014)
- [4] Gracioso, L. H., Vieira, P. B., Baltazar, M. P. G., Avanzi, I. R., Karolski, B., Nascimento, C. A. O., & Perpetuo, E. A. (2018). *Removal of phenolic compounds from raw industrial wastewater by Achromobacter sp. isolated from a hydrocarbon-contaminated area. Water and Environment Journal*. doi:10.1111/wej.12367
- [5] Pope, C. N., Schlenk, D., Baud, F. J., History and basic concepts of toxicology; Belden, J., Introduction to ecotoxicology; Scott, J., Minghetti, M., Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology, u: Pope, C. N., Liu, J., An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, 2020., str. 3–15, 381–393, 477–486.
- [6] Qi, J., Lee, S., Zhang, X., Sadeghi, A.M., McCarty, G.W., Moglen, G.E., A coupled surface water storage and subsurface water dynamics model in SWAT for characterizing hydroperiod of geographically isolated wetlands, *Adv. Water Resour.*, 131 (2019), Article 103380, [10.1016/j.advwatres.2019.103380](https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2019.103380)
- [7] Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., et al. (2020) Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study. *Lancet*, 395, 507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- [8] Huang, Z., Lin, Q., Luo, H., Guo, P., Weng, Q., Lei, Y., Cheng, S., Liu, S.S., Degradation of progesterone by coexisting free radical and nonradical pathways in the CuO/HNTs-PS system, *Chemical Engineering Journal*, Volume 398, 2020, 125458, ISSN 1385-8947, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125458>.
- [9] Liu, Y., & Wu, Y.-F. Early Detection of Fake News on Social Media Through Propagation Path Classification with Recurrent and Convolutional Networks. *Proceedings of the AAAI Conference on Artificial Intelligence*, 32(1), 2018. <https://doi.org/10.1609/aaai.v32i1.11268>
- [10] Ma, W., Zhang, S., Chen, Y., Zhong, D., Du, Q., Li, J., Li, R., Du, X., Zhang, J., & Yu, T. (2022). Fe₃O₄-CuO@Lignite activated coke activated persulfate advanced treatment of phenolic

wastewater from coal chemical industry. *Environmental research*, 213, 113601.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113601>

[11] Shi, X., Zhang, Y., Chen, X., Zhang, Y., Ma, Q., Lin, G., The response of an ethanol pool fire to transverse acoustic waves, *Fire Safety Journal*, Volume 125, 2021, 103416, ISSN 0379-7112, <https://doi.org/10.1016/j.firesaf.2021.103416>.

[12] Campanella, L., Beone, T., Sammartino, M. and Tomassetti, M., Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. *Analyst* 118, pp. 979–986, 1993

[13] Wallace, J., "Phenol" In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 4th Ed.: John Wiley and Sons, New York, pp. 592–602, 1996

[14] Delfino, F., Dube, D., Persistent contamination of ground water by phenol. *J. environ. sci. health*. 43, 345, 1976.

[15] Anku, W. W., Mamo, M. A., & Govender, P. P. (2017). Phenolic Compounds in Water: Sources, Reactivity, Toxicity and Treatment Methods. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. doi:10.5772/66927

[16] Davidson, R. S., The photodegradation of some naturally occurring polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 33, pp. 3–25, 1996.

[17] USEPA. Ambient Water Quality Criteria DOC: Phenol. US EPA-440/5-80-066 (PB 81-117772). pp. 1100–1156, 1980

[18] Sheets Fact. Breast Cancer & The Environment Research Centers. 2007.

[19] Tsuruta, Y., Watanabe, S. and Inoue, H., Fluorometric determination of phenol and p-cresol in urine by precolumn high-performance liquid chromatography using 4-(N-phthalimidinyl) benzenesulfonyl chloride. *Analytical Biochemistry* 243, pp. 86–91, 1996

[20] Toms, A. and Wood, J. M. Degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochemistry* 9, pp. 337–343, 1970.

[21] Max, B., Tugores, F., Cortés-Diéguez, S. and Domínguez, J. M. Bioprocess design for the microbial production of natural phenolic compounds by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168, pp. 2268–2284, 2012.

[22] Jaromir, M., Ożadowicz, R., Duda, W., Analysis of chlorophenols, chlorocatechols, chlorinated methoxyphenols and monoterpenes in communal sewage of Łódź and in the Ner river in 1999-2000. 16, 205, 2005.

- [23] Thurman, C., Phenols. In: Encyclopedia of chemical terminology. Vol. 7. Wiley, Toronto, 1982., pp. 373–384.
- [24] U.S. Environmental Protection Agency. 1980. Ambient water quality criteria reports. Office of Water Regulations and Standards, Washington, D.C
- [25] Keith, L. H. Identification and analysis of organic pollutants in water. In: Keith LH, Ann Arbor Sci, Ann Arbor, 1976., MI. Ch 36 pp 671
- [26] Bekins, B. A., Godsy, E. M., Goerlitz, D. F., Modeling steady-state methanogenic degradation of phenols in groundwater, *Journal of Contaminant Hydrology*, Volume 14, Issues 3–4, 1993, Pages 279-294, ISSN 0169-7722, [https://doi.org/10.1016/0169-7722\(93\)90029-R](https://doi.org/10.1016/0169-7722(93)90029-R).
- [27] Sheets Fact. Breast Cancer & The Environment Research Centers. 2007.
- [28] Paasivirta, J. H. K., Humppi, T., Karjalainen, A., Knuutinen, J., Maëntykoski, K., Paukku, R., Piilola, T., Surma-Aho, K., Tarhanen, J., Welling, L. and Vihonen, H., Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in environment. *Chemosphere* 14, pp. 469–491, 1985
- [29] Mishra, L., Paul, K. K., Jena, S., Coke wastewater treatment methods: Mini review, *J. Indian Chem. Soc.* 98 (2021) 100133, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100133>
- [30] Hussain, A., Dubey, S. K., Kumar, V., Kinetic study for aerobic treatment of phenolic wastewater, *Water Resour. Ind.* 11 (2015) 81–90, doi: <https://doi.org/10.1016/j.wri.2015.05.002>.
- [31] Wade, Leroy G. "phenol". *Encyclopedia Britannica*, 23 Nov. 2018, <https://www.britannica.com/science/phenol> (pristup 11.04.2024.)
- [32] Michaleas, S. N., Laios, K., Charalabopoulos, A., et al. (December 21, 2022) Joseph Lister (1827-1912): A Pioneer of Antiseptic Surgery. *Cureus* 14(12): e32777. doi:10.7759/cureus.32777
- [33] Clegg, B., Phenol, *A Chemistry World*, (2014).
- [34] De la Rosac Moreno-Escamilla, L. A., J. O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E., Chapter 12 - Phenolic Compounds, Editor(s): Elhadi M. Yahia, *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Woodhead Publishing, 2019, Pages 253-271, ISBN 9780128132784, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>.
- [35] Róžański, L., *The transformations of pesticides in living organisms and the environment*, Agra-enviro lab. Poznań. 1998.
- [36] Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., *Principles of Ecotoxicology*, 3th Edition, Taylor&Francis Group, Boca Raton, 2006., USA.

- [37] Brune, K., Renner, B., Tiegs, G., Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. *European Journal of Pain*, 2014., 19(7), 953–965. doi:10.1002/ejp.621
- [38] Pope, C.N., Schlenk, D., Baud, F.J., History and basic concepts of toxicology; J. Belden, Introduction to ecotoxicology; J. Scott, M. Minghetti, Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology, u: C.N. Pope, J. Liu, *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*, 2020., str. 3–15, 381–393, 477–486., doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813602-7.00001-6>
- [39] Doherty, M., Hawkey, C., Goulder, M., Gibb, I., Hill, N., Aspley, S., Reader, S., A randomised controlled trial of ibuprofen, paracetamol or a combination tablet of ibuprofen/paracetamol in community-derived people with knee pain. *Ann Rheum Dis* 70, 2011., 1534–1541.
- [40] Kučić Grgić, D., Primjena ekotoksikologije, Materijali za predavanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2023.
- [41] Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J., Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials, 2017., str.51–82. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809199-9.00003-3>
- [42] International-Standard (ISO 11348), Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), 2007.
- [43] International-Standard (ISO 19040-1), Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*), 2018.
- [44] OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.
- [45] OECD, Guideline for Testing of Chemicals, Terrestrial Plant Test, 208. Seedling Emergence and Seedling Growth Test, 2003.
- [46] International-Standard (ISO 21115), Water quality - determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1), 2019.
- [47] McCarty, L.S., Borgert, C.J., Posthuma, L., The regulatory challenge of chemicals in the environment: Toxicity testing, risk assessment, and decision-making models, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 99 (2018) 289–295., doi: 10.1016/j.yrtph.2018.10.001.
- [48] Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Skripta iz laboratorijskih vježbi iz kolegija ekotoksikologija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Ak. Godina 2022/2023

- [49] https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html (pristup 18.04.2024.)
- [50] Michałowicz, J., Duda, W., Phenols – Sources and Toxicity. Polish Journal of Environmental Studies., 2007., 16. 347-362.
- [51] Hansch, C., McCarns, S., Smith, C., Dodittle, D., Comparative Qsar evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. chem. biol. interact. 127, 61, 2000
- [52] Boyd, E., Killham, K., Meharg, A., Toxicity of mono-, di- and tri-chlorophenols to lux marked terrestrial bacteria *Burkholderia species* Rasc C2 and *Pseudomonas fluorescens*. microbiol. let. 43, 157, 2001.
- [53] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Phenol, 2008. US Department of Health and Human Services: Atlanta, US
- [54] Bruce, R. M., Santodonato, J. and Neal, M. W., Summary review of the health effects associated with phenol. Toxicology and Industrial Health 3, pp. 535–568, 1987
- [55] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008. Toxicological profile for phenol. Division of toxicology and environmental medicine/applied toxicology branch US Department of health and human services. Georgia, United States. 2008; 1–20.
- [56] Taghreed, A. K., and Muftah, H.E., Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review. Crit Rev Environ Sci. Tec. 2012; 42: 1631–1690.
- [57] Yang, C.F., and Lee, C.M., Enrichment, isolation, and characterisation of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. strain P-6. Intern. Biodeterior. Biodegrad. 2007; 59: 206–210.
- [58] Kafka, Z., Punčochárová, J., Hrebíková, M., & Kuraš, M. (1999). Determination of acute toxicity of phenol type compounds. Toxicological & Environmental Chemistry, 69(1-2), 133–137. doi:10.1080/02772249909358694
- [59] Guerra, R. (2001). Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. Chemosphere, 44(8), 1737–1747. doi:10.1016/s0045-6535(00)00562-2
- [60] Kaiser, K.L.E., Ribo, J.M., 1988. Photobacterium phosphoreum toxicity bioassay. II. Toxicity data compilation. Toxicity Assessment 3, 195±237
- [61] Keen, R., Baillod, C.R., 1985. Toxicity to Daphnia of the end product of wet oxidation of phenol and substituted phenols. Wat. Res. 19 +6), 764±772

- [62] Aruoja, V., Sihtmäe, M., Dubourguier, H.-C., & Kahru, A. (2011). Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: Comparison with published data and QSARs. *Chemosphere*, 84(10), 1310–1320. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.023
- [63] Scragg, A. H. (2006). The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 796–799. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.12.018
- [64] Sharma, H.A., Barber, J.T., Ensley, H.E., Polito, M.A., A comparison of the toxicity and metabolism of phenol and chlorinated phenols by *Lemna gibba* with special reference to 2,4,5-trichlorophenol. *Environ Toxicol Chem* 1997;16:346–50.
- [65] Leonard, D., Lindley, N.D., Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbations of phenol hydroxylase activity. *Enzyme Microb Technol* 1999;25:271–7
- [66] Heipieper, H.J., Diefenbach, R., Keweloh, H., Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol- degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:1847–52.
- [67] Weber, F.J., de Bont, J.A.M., Adaptation mechanism to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1996;1286:225–45.
- [68] Gomaa, M., El-Naeb, E.H., Hifney, A.F., Adam, M.S., Fawzy, M.A., Hormesis effects of phenol on growth and cellular metabolites of *Chlorella* sp. under different nutritional conditions using response surface methodology. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023 Apr;30(19):56904-56919. doi: 10.1007/s11356-023-26249-1. Epub 2023 Mar 17. PMID: 36928704; PMCID: PMC10121499.
- [69] Cho, K., Lee, C.H.H., Ko, K., et al. Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliellasalina*. *Algal Res.* 2016;17:61–66. doi: 10.1016/j.algal.2016.04.023.
- [70] Adams, M.S., Stauber, J.L., Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environ Toxicol Chem.* 2004;23:1957–1968. doi: 10.1897/03-232.
- [71] Aruoja, V., Sihtmäe, M., Dubourguier, H.-C., Kahru, A., Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: Comparison with published data and QSARs. *Chemosphere.* 2011;84:1310–1320. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.023.

- [72] Tan, X., Dai, K., Parajuli, K., et al. Effects of phenolic pollution on interspecific competition between *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* and their photosynthetic responses. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16:3947. doi: 10.3390/ijerph16203947.
- [73] Newsted, J.L., Effect of light, temperature, and pH on the accumulation of phenol by *Selenastrumcapricornutum*, a green alga. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;59:237–243. doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.07.009.
- [74] Christensen, D. G., & Visick, K. L. (2020). *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage, and Common Phenotypic Assays. *Current Protocols in Microbiology*, 57(1). doi:10.1002/cpmc.103
- [75] Dunn, A. K. (2012). *Vibrio fischeri* Metabolism. *Advances in Bacterial Respiratory Physiology*, 37–68. doi:10.1016/b978-0-12-394423-8.00002-0
- [76] Cohen, M. L., Mashanova, E. V., Rosen, N. M., & Soto, W. (2019). Adaptation to temperature stress by *Vibrio fischeri* facilitates this microbe's symbiosis with the Hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*). *Evolution*, 73, 1885–1897. doi: 10.1111/evo.13819.
- [77] <https://www.icr.org/article/bobtail-squids-cloaking-device> (pristup 19.04.2024.)
- [78] Biologija.com.hr, Bioluminiscencija – fascinantna svjetlost iz morskih dubina, <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8363> (pristup 23. travnja 2024.)
- [79] Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.
- [80] Nakazawa, T., Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* 4(12):782–786. 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x>
- [81] <https://bacdive.dsmz.de/strain/131000> (preuzeto 26.04.2024.)
- [82] Hafner, C., *Pseudomonas putida* Growth Inhibition Test, u: Moser, H., Römbke, J., *Ecotoxicological Characterization of Waste*, Njemačka, 2009., str. 153–159.
- [83] Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., van der Lelie, D., Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* 2011, 35(2):299-32
- [84] Yoshino, Y., Kitazawa, T., Kamimura, M., Tatsuno, K., Ota, Y., Yotsuyanagi, H., *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother*. 2011;17(2):278–82.

- [85] Jayabalan, J., Mani, G., Krishnan, N., Pernabas, J., Devadoss, J. M., Jang, H. T., Green biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Pseudomonas putida* culture and its In vitro antibacterial and anti-biofilm activity, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21 (2019) 101327.
- [86] International-Standard (ISO 10712), Water quality — *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test), 1995.
- [87] Kucerova, R. (2006). Primjena *Pseudomonas putida* i *Rhodococcus* sp. za biorazgradnju PAH, PCB i NEL u uzorcima tla s odlagališta opasnog otpada u Pozdatky (Republika Češka). *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, 18 (1), 97-101. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/7339>
- [88] International-Standard (ISO 10712), Water quality — *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test), 1995
- [89] Wu, H.-L., Hseu, R.-S., Lin, L.-P., Identification of *Chlorella* sp. isolates using ribosomal DNA sequences, *Grad. Inst. of Agri. Chem.*, 42 (2001) 115-121.
- [90] 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, *Bior. Tech.*, 102 (2011) 5138-5144.
- [91] https://www.researchgate.net/figure/Chlorella-vulgaris_fig2_300505269 (pristup 09.05.2024.)
- [92] https://www.researchgate.net/figure/Chlorella-sorokiniana-PAZ-under-100magnification_fig2_301887952 (pristup 09.05.2024.)
- [93] https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-FOTOMICROGRAFIA-DA-Chlorella-minutissima-LEB108-AUMENTO-DE-40-X_fig2_26981038 (pristup 09.05.2024.)
- [94] https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=211-6 (pristup 09.05.2024.)
- [95] International-Standard (ISO 10712), Water quality — *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test), 1995
- [96] HRN EN ISO 11348-1:2000, Kakvoća vode - Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) -- 1. dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju svježe pripremljene bakterije (ISO 11348- 1:1998; EN ISO 11348-1:1998)