



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ana Tutić

**PROCJENA EKOTOKSIČNOSTI I POTENCIJALA
BIORAZGRADNJE FENOLA, CIJANIDA I
TIOCIJANATA U VODENOM OKOLIŠU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Ana Tutić

**ASSESSMENT OF ECOTOXICITY AND
BIODEGRADATION POTENTIAL OF PHENOL,
CYANIDE AND THIOCYANATE IN AQUATIC
ENVIRONMENT**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ana Tutić

**PROCJENA EKOTOKSIČNOSTI I POTENCIJALA
BIORAZGRADNJE FENOLA, CIJANIDA I
TIOCIJANATA U VODENOM OKOLIŠU**

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Ana Tutić

**ASSESSMENT OF ECOTOXICITY AND
BIODEGRADATION POTENTIAL OF PHENOL,
CYANIDE AND THIOCYANATE IN AQUATIC
ENVIRONMENT**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Dajana Kučić Grgić, PhD

Zagreb, 2025

Bibliografska stranica

- ❖ Bibliografski podaci:
- ❖ UDK: (univerzalna decimalna klasifikacija – saznaje se u BIC-u)
- ❖ Znanstveno područje: tehničke znanosti
- ❖ Znanstveno polje: kemijsko inženjerstvo
- ❖ Znanstvena grana: zaštita okoliša u kemijskom inženjerstvu
- ❖ Institucija: Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za industrijsku ekologiju
- ❖ Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
- ❖ Broj stranica: 165
- ❖ Broj slika: 57
- ❖ Broj tablica: 33
- ❖ Broj priloga: 0
- ❖ Broj literaturnih referenci: 147
- ❖ Datum obrane:
- ❖ Sastav povjerenstva za obranu:
 - prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije;
 - doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije;
 - izv. prof. dr. sc. Ivan Brnardić, Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet
- ❖ Rad je pohranjen u:
 - Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4, 10 000 Zagreb; Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 28. listopada 2024. te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj 18. veljače 2025.

Zahvala

Neizmjerne sam zahvalna na prilici koja mi se ukazala, da učim i surađujem s timom predivnih ljudi i još boljih znanstvenika na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom protekle četiri godine, mnogo je figura na ovaj ili onaj način utjecalo na moj rad, postignuća i život te se svakome ovim putem želim zahvaliti.

Prije svega, hvala tvrtki BP group d.o.o. za apsolutni vjetar u leđa počevši od ideje upisa na doktorski studij pa sve do realizacije.

Hvala prof. emer. dr. sc. Laszlu Sipos što me naučio kritičkom razmišljanju i uvjerio da svaki eksperimentalni problem ima i svoje rješenje ako mu se dovoljno posvetimo. Hvala mr. sc. Marinku Markiću na praktičnoj pomoći i bezuvjetnom strpljenju. Hvala prvom prijateljskom licu koje sam ugledala na FKIT-u, Viktoriji Martinjak, na pjesmi, smijehu, svim zabavnim razgovorima, ali i utjesi kada je bilo potrebno. Hvala i Kristini Bule Možar čiji je smijeh ispunjavao hodnike FKIT-a, a naša druženja pauze između eksperimenata. Hvala dragoj Marijani Vidaković koja je svaki moj upit dočekala s osmjehom. Hvala doc. dr. sc. Matiji Cvetniću na svemu što me naučio o kromatografiji i na ljubaznosti bez obzira na količinu mojih pitanja. Hvala dr. sc. Lidiji Furač na podršci i lijepim riječima. Hvala prof. dr. sc. Šimi Ukiću što je velikim dijelom upotpunio moj znanstveni rad.

Ipak, najveća hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić-Grgić i asistentici dr. sc. Martini Miloloža Nikolić. Draga Dajana, hvala na nesebičnoj pomoći, savjetima, prijateljskom pristupu, susretljivosti, vremenu i volji koju si pokazala tijekom mog studiranja. Bolju mentoricu nisam mogla poželjeti. Draga Martina, hvala na ogromnoj količini posla koju si bespogovorno odrađivala, na svemu što si me naučila i što si mi tijekom vremena postala više od kolegice.

Hvala Vam svima na pomoći i što ste me prihvatili kao punopravnog člana svog tima, učinili ste moj život u Zagrebu ispunjenim.

Zahvaljujem se svojim roditeljima na podršci u svakom smislu te riječi, hvala Vam što ste me ohrabrivali kroz život i postavljali svoja leđa kad god je trebalo da ja danas budem gdje jesam.

Hvala mom zaručniku Marku na ljubavi i potpori, a najviše na beskonačnom razumijevanju.

Posveta

Ovaj doktorski rad posvećujem svojoj prevoljenoj baki, Božici Tišljer, koja je bila moj životni orijentir i koja me tijekom odrastanja svakodnevno podsjećala koliko je važno obrazovanje. Hvala ti.

SAŽETAK

Uslijed ubrzane industrijalizacije i urbanizacije, neizbježan je intenzivan porast onečišćenja tla, zraka i vodenih resursa. Fenolni spojevi i cijanidi, koji su uvršteni među prioritetne onečišćujuće tvari, često se pojavljuju zajedno s tiocijanatima u industrijskim otpadnim vodama koje potječu iz koksne, kemijske, rudarske i srodnih industrija. Iako industrijski ispusti obično sadržavaju složene kombinacije organskih i anorganskih onečišćujućih tvari, istraživanja usmjerena na ekotoksičnost i biorazgradivost smjesa još su uvijek rijetka. Većina dosadašnjih istraživanja bila je fokusirana na pojedinačne organske spojeve.

Cilj ovog doktorskog rada bio je procijeniti ekotoksičnost i potencijal biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata kao znakovitih industrijskih onečišćujućih tvari. U prvoj fazi provedena je analiza toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata pojedinačno primjenom pet testnih organizama različitih trofičkih razina: bakterije *Aliivibrio fischeri*, bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp., vodene leće *Lemna minor* i sjemenki luka *Allium cepa*. Procjena ekotoksičnosti binarnih i ternarnih smjesa fenola, cijanida i tiocijanata provedena je pomoću *Aliivibrio fischeri*, a eksperimentalni podaci integrirani su u matematičke modele radi analize mogućih međudjelovanja između komponenata smjese. U drugoj fazi ispitivan je potencijal biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata primjenom bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. i njihove mješovite kulture. Preliminarni pokusi poslužili su za odabir najuspješnijeg mikroorganizma, pri čemu se *Chlorella* sp. pokazala najperspektivnijom. Glavni pokus biorazgradnje proveden je s mikroalgom *Chlorella* sp. prema *full factorial* dizajnu, a procesni parametri optimizirani su primjenom metodologije odzivne površine (RSM). U svrhu procjene detoksikacijskog učinka, nakon biorazgradnje proveden je test toksičnosti filtrata pomoću *Aliivibrio fischeri*.

Dobiveni rezultati ukazali su na izraženu toksičnost cijanida, sinergističke učinke smjesa, te djelomičnu učinkovitost *Chlorella* sp. u uklanjanju ispitivanih spojeva. Fenol je potpuno uklonjen u svim uvjetima, dok je razgradnja cijanida i osobito tiocijanata bila ograničena i snažno ovisna o početnoj koncentraciji i biomasi mikroorganizma. Statističko modeliranje potvrdilo je da su početna koncentracija smjese i optička gustoća mikroalge ključni čimbenici koji utječu na učinkovitost procesa. Unatoč visokoj učinkovitosti biorazgradnje, analiza toksičnosti nakon biorazgradnje ukazala je na prisutnost razgradnih produkata s potencijalno pojačanim toksičnim učinkom, čime se dodatno naglašava složenost stvarnih okolišnih sustava.

Ključne riječi: fenol, cijanid, tiocijanat, ekotoksičnost, biorazgradnja, matematičko modeliranje

SUMMARY

Due to accelerated industrialization and urbanization, a pronounced increase in the pollution of soil, air, and water resources is inevitable. Phenolic compounds and cyanides, classified among priority pollutants, are often found together with thiocyanates in industrial wastewaters originating from coking, chemical, mining, and related industries. Although industrial effluents usually contain complex mixtures of organic and inorganic contaminants, research focusing on the ecotoxicity and biodegradability of such mixtures is still scarce. Most previous studies have predominantly addressed individual organic compounds.

The aim of this doctoral thesis was to assess the ecotoxicity and biodegradation potential of phenol, cyanide, and thiocyanate as significant industrial pollutants. In the first phase, the toxicity of phenol, cyanide, and thiocyanate was evaluated individually using five test organisms representing different trophic levels: bacterium *Aliivibrio fischeri*, bacterium *Pseudomonas putida*, microalga *Chlorella* sp., aquatic macrophyte *Lemna minor*, and onion seeds (*Allium cepa*). The ecotoxicity of binary and ternary mixtures of phenol, cyanide, and thiocyanate was assessed using *Aliivibrio fischeri*, and the experimental data were incorporated into mathematical models to analyse possible interactions between the mixture components. In the second phase, the biodegradation potential of the ternary mixture was examined using *Pseudomonas putida*, *Chlorella* sp., and their mixed culture. Preliminary tests served to identify the most efficient microorganism, with *Chlorella* sp. proving to be the most promising candidate. The main biodegradation experiment was performed with *Chlorella* sp. following a full factorial design, and process parameters were optimized by applying response surface methodology (RSM). To evaluate the detoxification effect, a toxicity test of the filtrates was carried out after biodegradation using *Aliivibrio fischeri*.

The results obtained revealed pronounced cyanide toxicity, synergistic effects of the mixtures, and partial effectiveness of *Chlorella* sp. in the removal of the examined compounds. Phenol was completely eliminated under all tested conditions, whereas the degradation of cyanide, and especially thiocyanate, was limited and strongly dependent on the initial concentration and microbial biomass. Statistical modelling confirmed that the initial concentration of the mixture and the optical density of the microalga were the key factors influencing process efficiency. Despite the high biodegradation efficiency, ecotoxicity analysis after the process indicated the presence of degradation products with potentially enhanced toxic effects, further emphasizing the complexity of real environmental systems.

Key words: phenol, cyanide, thiocyanate, ecotoxicity, biodegradation, mathematical modelling

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. OTPADNA VODA TEŠKE INDUSTRIJE	3
2.2. FENOL	3
2.2.1. <i>Prirodni izvori fenola u vodi i tlu.....</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Antropogeni izvori fenola u vodi i tlu.....</i>	<i>5</i>
2.3. CIJANID	6
2.3.1. <i>Prirodni izvori cijanida u vodi i tlu.....</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>Antropogeni izvori cijanida u vodi i tlu</i>	<i>7</i>
2.4. TIOCIJANAT	8
2.4.1. <i>Prirodni izvori tiocijanata u vodi i tlu</i>	<i>8</i>
2.4.2. <i>Antropogeni izvori tiocijanata u vodi i tlu</i>	<i>9</i>
2.5. EKOTOKSIČNOST I PROCJENA EKOTOKSIČNOSTI	9
2.5.1. <i>Test toksičnosti s bakterijom Aliivibrio fischeri.....</i>	<i>11</i>
2.5.2. <i>Test toksičnosti s bakterijom Pseudomonas putida.....</i>	<i>13</i>
2.5.3. <i>Test toksičnosti s mikroalgom Chlorella sp.</i>	<i>14</i>
2.5.4. <i>Test toksičnosti s vodenom lećom Lemna minor</i>	<i>15</i>
2.5.5. <i>Test toksičnosti sa sjemenkama luka Allium cepa.....</i>	<i>16</i>
2.6. TOKSIČNOST FENOLA	17
2.7. TOKSIČNOST CIJANIDA	21
2.8. TOKSIČNOST TIOCIJANATA	22
2.9. MATEMATIČKI MODELI U PROCJENI TOKSIČNOSTI SMJESA.....	23
2.9.1. <i>Model koncentracijske adicije.....</i>	<i>24</i>
2.9.2. <i>Model neovisnog djelovanja.....</i>	<i>25</i>
2.10. BIORAZGRADNJA.....	26
2.10.1. <i>Optimizacija procesa biorazgradnje.....</i>	<i>27</i>
2.10.2. <i>Biorazgradnja fenola.....</i>	<i>28</i>
2.10.2.1. <i>Mehanizam aerobne biorazgradnje fenola</i>	<i>32</i>
2.10.2.2. <i>Mehanizam anaerobne biorazgradnje fenola.....</i>	<i>33</i>
2.10.3. <i>Biorazgradnja cijanida</i>	<i>34</i>
2.10.3.1. <i>Metabolički putevi biorazgradnje cijanida</i>	<i>36</i>
2.10.4. <i>Biorazgradnja tiocijanata</i>	<i>41</i>

2.10.4.1. Karbonilni put razgradnje tiocijanata	43
2.10.4.2. Cijanatni put razgradnje tiocijanata.....	43
2.10.4.3. Anaerobna razgradnja tiocijanata.....	44
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	45
3.1. FENOL, CIJANID I TIOCIJANAT	45
3.2. PRIMIJENJENI TESTOVI TOKSIČNOSTI	48
3.2.1. Test inhibicije luminiscencije s morskom bakterijom <i>Aliivibrio fischeri</i>	49
3.2.2. Test inhibicije rasta s bakterijom <i>Pseudomonas putida</i>	52
3.2.3. Test inhibicije rasta s mikroalgom <i>Chlorella sp.</i>	56
3.2.4. Test inhibicije rasta s vodenom lećom <i>Lemna minor</i>	59
3.2.5. Test klijavosti s <i>Allium cepa</i>	63
3.3. TEST BIORAZGRADNJE	68
3.3.1. Priprema mikroorganizama	68
3.3.2. Preliminarni pokusi biorazgradnje	69
3.3.3. Glavni pokus biorazgradnje.....	71
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	74
4.1. REZULTATI TESTOVA TOKSIČNOSTI	74
4.1.1. Rezultati testa toksičnosti s <i>Aliivibrio fischeri</i>	74
4.1.2. Rezultati testa toksičnosti sa <i>Pseudomonas putida</i>	75
4.1.3. Rezultati testa toksičnosti s <i>Chlorella sp.</i>	82
4.1.4. Rezultati testa toksičnosti s <i>Lemna minor</i>	89
4.1.5. Rezultati testa toksičnosti s <i>Allium cepa</i>	96
4.1.6. Ukupna analiza toksičnosti	101
4.1.7. Toksičnost smjese fenola, cijanida i tiocijanata	104
4.2. BIORAZGRADNJA SMJESE.....	109
4.2.1. Rezultati prvog preliminarnog pokusa	109
4.2.2. Rezultati drugog preliminarnog pokusa.....	115
4.2.3. Rezultati glavnog pokusa biorazgradnje.....	122
4.2.4. Optimizacija procesa biorazgradnje.....	139
5. ZAKLJUČAK.....	148
6. LITERATURA	151

1. UVOD

Onečišćenje vode nastaje kada se onečišćujuće tvari izravno ili neizravno ispuštaju u prirodna vodena tijela bez odgovarajuće obrade [1]. Nedostatak pitke vode postaje ozbiljan i po život opasan problem, a posljednjih godina svjedočimo i političkim sukobima uzrokovanim nestašicom iste [2]. U protekla tri desetljeća, sve stroži zahtjevi usmjereni su na zaštitu vodenih resursa, ponajprije zbog globalne nestašice pitke vode, ali i zabrinjavajućeg porasta učestalosti neuroloških poremećaja kod ljudi i životinja uzrokovanih toksinima iz okoliša [3].

Od sedamdesetih do devedesetih godina prošlog stoljeća, obrada otpadnih voda bila je usredotočena uglavnom na smanjenje i eliminaciju plutajućeg i suspendiranog materijala, biokemijske potrošnje kisika (BPK₅) te patogena. Od 1990-ih godina, zbog širenja tehničkog znanja i razvoja znanstvene svijesti, obrada industrijskih otpadnih voda počinje se fokusirati i na ekološke te zdravstvene probleme povezane s toksičnim tvarima koje otpadnom vodom dopijevaju u okoliš. Kako bi se ispunili propisani standardi, industrija se danas usmjerava na primjenu učinkovitih, održivih i ekonomičnih tehnologija kojima se toksične tvari razgrađuju u manje opasne ili pak potpuno bezopasne pri čemu se kao jedno od najperspektivnijih rješenja nameće biorazgradnja [4]. Međutim, tvari koje su otporne na biorazgradnju mogu se zadržavati u tlu i akumulirati u životinjskim i ljudskim tkivima, zbog čega je nužno razumjeti mehanizme mikrobne razgradnje kako bi se razvili učinkoviti sustavi bioremedijacije [5].

U kontekstu industrijskih otpadnih voda, posebnu pažnju zaslužuju spojevi poput fenola, cijanida i tiocijanata koji se zajedno nalaze u otpadnoj vodi koksne industrije. Fenol je kemijski stabilan spoj koji može dugo perzistirati u vodenim otopinama, ima tendenciju akumulacije u tlu te sposobnost migracije iz tla u vodene ekosustave [6]. Cijanidi su soli cijanovodične kiseline (HCN), a oblik u kojem su prisutni u vodenoj otopini ovisi o pH vrijednosti iste. Najtoksičniji oblik cijanida je tzv. slobodni cijanid koji obuhvaća cijanovodik (HCN) i slobodni cijanidni anion (CN⁻), odnosno sve oblike koji nisu vezani u stabilne metalne komplekse [3]. Prema Direktivi Europske unije [7], maksimalne dopuštene koncentracije (MDK) fenola i slobodnog cijanida u industrijskim efluentima koji se ispuštaju u prirodni recipijent obično su postavljene na 0,1 mg/L. U vodenom okolišu tiocijanat je otporniji na biorazgradnju u odnosu na cijanid. Štoviše, poznato je da nepotpuna oksidacija tiocijanata može rezultirati nastajanjem cijanida. Unatoč tome, zbog njegove znatno niže toksičnosti u usporedbi s fenolom i cijanidom, tiocijanat se često zanemaruje i trenutačno nije pod odgovarajućim regulatornim nadzorom [4].

Osim što pojedinačno predstavljaju rizik, međusobne interakcije fenola, cijanida i tiocijanata mogu značajno promijeniti ukupnu toksičnost uzorka koja je još uvijek neistražena. Testovi toksičnosti omogućuju uvid u biološke učinke pojedinih tvari, ali i njihovih smjesa, koje mogu pokazivati aditivna, sinergijska ili antagonistička djelovanja [8]. S obzirom na to da testovi toksičnosti mogu biti vremenski i tehnički zahtjevni, osobito kada se ispituje velik broj tvari i njihovih kombinacija, matematički modeli nameću se kao brža, jednostavnija i financijski isplativija alternativa za procjenu toksičnosti smjesa. Takvi modeli doprinose razumijevanju mehanizama djelovanja tvari u smjesama. Integracija matematičkog modeliranja u toksikološku procjenu pomaže u predviđanju rizika i razvoju efikasnijih strategija kontrole onečišćenja [8]. Ovo istraživanje usmjereno je na procjenu ekotoksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata te njihovih smjesa, s ciljem razjašnjavanja njihovog ekološkog utjecaja. Osim toga, cilj je ispitati i potencijal biorazgradnje smjese navedenih tvari pomoću mikroalge *Chlorella* sp. te doprinijeti razvoju integriranog pristupa procjeni rizika industrijskih otpadnih voda.

2. OPĆI DIO

2.1. Otpadna voda teške industrije

Teška industrija, osobito proizvodnja koksa i čelika, jedan je od najvećih potrošača vode i istovremeno jedan od najznačajnijih izvora otpadne vode. Tijekom procesa proizvodnje koksa nastaju enormne količine izrazito toksične otpadne vode kompleksnog kemijskog sastava. Ove otpadne vode sadrže visoke koncentracije fenola, cijanida i tiocijanata te se svrstavaju među najzahtjevnije za obradu u industrijskoj praksi [9, 10]. **Tablica 1** prikazuje koncentracije fenola, cijanida i tiocijanata izmjerene u otpadnoj vodi koksne industrije.

Tablica 1 Koncentracije fenola, cijanida i tiocijanata izmjerene u otpadnoj vodi koksne industrije

fenol [mg/L]	cijanid [mg/L]	tiocijanat [mg/L]	literatura
560	200	56	[11]
384 – 534	12 – 24	367 – 642	[12]
400 – 1200	4 – 15	200 – 500	[13]
100 – 221	11 – 41	198 – 427	[14]
483	8,2	361	[15]
2500	10 – 50	100 – 300	[16]

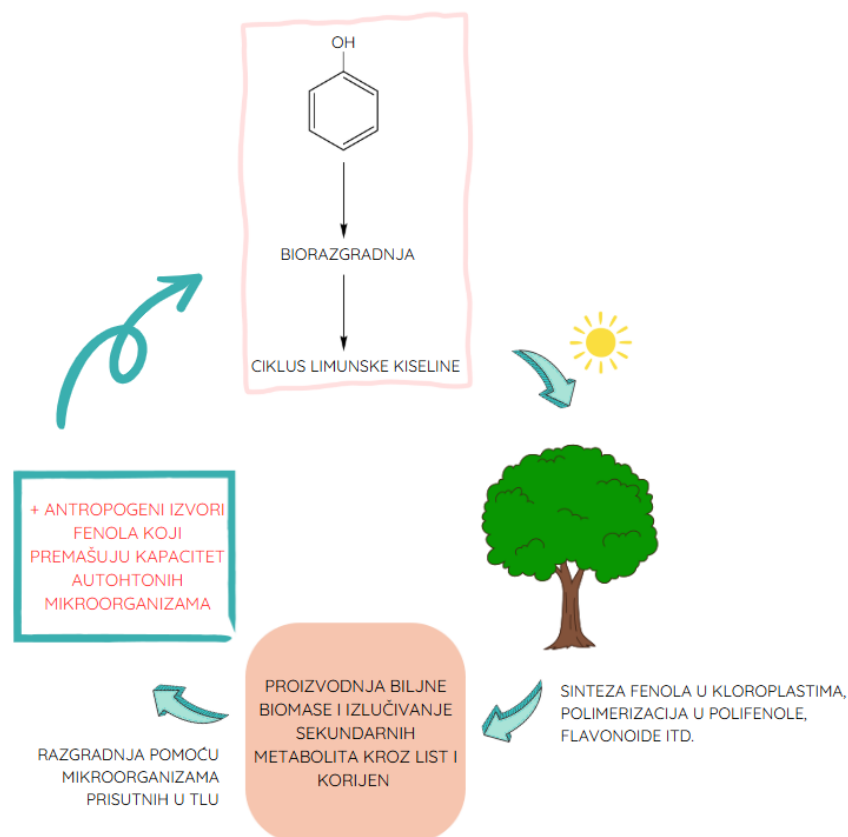
2.2. Fenol

Fenol je organska molekula koju karakterizira hidroksilna (-OH) skupina povezana s jednim atomom ugljika u aromatičnom benzenskom prstenu molekularne formule C_6H_5OH . Najjednostavniji fenol naziva se i monohidroksibenzen ili karbolna kiselina, a svi ostali članovi skupine derivati su fenola. Na sobnoj temperaturi fenol je kristalna higroskopna tvar bijele boje koja na zraku mijenja boju u ružičastu ili crvenu [17]. Ima sladak, katranski miris i topiv je u alkoholu, glicerolu, petroleju i vodi [18]. Visoka razina topivosti u vodi (8,28 g/100 mL) doprinosi njegovoj perzistenciji u vodenim ekosustavima u visokim koncentracijama [19]. Rezultat topivosti u vodi onečišćenje je površinskih i podzemnih voda te tla [1]. Oko 14 % fenola iz industrijskih otpadnih voda dopiye u tlo [20]. Prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020), MDK fenola u otpadnim vodama koje se ispuštaju u površinske vode iznosi 0,1 mg/L. Iznimka su otpadne vode iz objekata i postrojenja za proizvodnju i preradu stakla i mineralnih vlakana, za koje je dopuštena viša emisijska

vrijednost, i ona iznosi 1 mg/L. Ova iznimka proizlazi iz činjenice da industrijski procesi u navedenim sektorima rezultiraju značajnim količinama fenola u otpadnim tokovima te je njihovo uklanjanje složenije i tehnološki zahtjevnije, što je uzeto u obzir pri definiranju realnih i provedivih graničnih vrijednosti. Za derivate fenola kao što je pentaklorofenol (PCP), MDK iznosi 0,04 mg/L, što ukazuje na veću toksičnost i postojanost u okolišu [21].

2.2.1. Prirodni izvori fenola u vodi i tlu

Biljke i mikroorganizmi prirodno sintetiziraju fenolne spojeve u vodenom i kopnenom ekosustavu, gdje se oni mogu pojaviti kao produkti sekundarnog metabolizma ili kao odgovor na različite stresne uvjete poput UV zračenja, prisutnosti teških metala, pesticida i mikrobnih infekcija [22]. U vodenim sustavima fenoli se dodatno oslobađaju razgradnjom biljnih i životinjskih ostataka, ali i ispiranjem tla bogatog organskom tvari [18, 23]. U biljci, sinteza fenola odvija se u kloroplastima, nakon čega se oni mogu polimerizirati u polifenole, flavonoide i druge derivate, koji se zatim izlučuju preko lišća i korijena u okoliš. Na taj način fenolni spojevi postaju dio složenih interakcija između biljaka i mikroorganizama u tlu. Fenoli prisutni u tlu podložni su različitim okolišnim procesima, uključujući sorpciju, kemijsku transformaciju i biorazgradnju, a njihov okolišni transport može dovesti do sekundarne kontaminacije površinskih i podzemnih voda putem otjecanja i procjeđivanja [22]. **Slika 1** ilustrira tok nastajanja, oslobađanja i biorazgradnje fenola. Biljke proizvode fenole u sklopu sekundarnog metabolizma i izlučuju ih u okoliš, gdje dolazi do njihove razgradnje putem autohtonih mikroorganizama. Produkti razgradnje potom se mogu uključiti u osnovne biokemijske procese, poput ciklusa limunske kiseline, čime se zatvara biogeokemijski krug ugljika. Međutim, dodatni antropogeni izvori fenola, primjerice industrijski ispusti, mogu premašiti sposobnost prirodne razgradnje, što dovodi do njihove akumulacije i toksičnih učinaka na ekosustave. Takve situacije dodatno naglašavaju važnost razumijevanja prirodne dinamike fenola u okolišu i uloge mikroorganizama u njihovoj eliminaciji [17].



Slika 1 Kruženje fenola u prirodi

2.2.2. Antropogeni izvori fenola u vodi i tlu

Antropogene aktivnosti značajno doprinose prisutnosti fenolnih spojeva u okolišu, pri čemu se kao glavni izvori ističu industrijski procesi, poljoprivredna praksa te uporaba proizvoda koji sadrže fenole u kućanstvima. Industrijsko ispuštanje fenola u vodene ekosustave najčešće potječe iz koksne, petrokemijske, farmaceutske i kemijske industrije, proizvodnje čelika te postrojenja za preradu drva i proizvodnje celuloze i papira [1]. Otpadne vode ovih sektora često se ispuštaju u površinske i podzemne vode putem nedovoljno obrađenih efluenata [24]. Poljoprivredna djelatnost predstavlja dodatni značajan izvor unosa fenola u okoliš, osobito kroz primjenu pesticida, herbicida i fungicida. Razgradnjom navedenih agrokemikalija nastaju fenolni derivati koji uslijed oborinskog ispiranja poljoprivrednih površina dospijevaju u tlo i vode. Dodatno, prema dostupnim izvješćima, fenol se svrstava među najčešće kemikalije uključene u slučajna izlivanja u morski okoliš. U skupini od 100 kemikalija koje se u većim količinama transportiraju brodovima između većih europskih luka, fenol je identificiran kao

jedna od tvari s većim potencijalom za slučajno ispuštanje. Zbog toga toksični učinci fenola na morske organizme izazivaju sve veću zabrinutost [25].

2.3. Cijanid

Cijanidi ($\text{C}\equiv\text{N}$) su soli cijanovodične kiseline koje sadrže cijanidnu funkcionalnu skupinu, sastavljenu od atoma ugljika u oksidacijskom stanju +2 povezanog trostrukom vezom s atomom dušika u oksidacijskom stanju -3 [26]. Ravnoteža između cijanidnog aniona i njegovog molekularnog oblika cijanovodika ovisi o konstanti disocijacije cijanovodika ($\text{pK}_a \approx 9,2$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$). Pri pH vrijednostima nižima od 9,2 prevladava molekularni oblik, dok pri višim pH vrijednostima dominira ionski oblik. Na primjer, pri pH 7 više od 99 % ukupnog cijanida prisutno je u obliku cijanovodika. U takvim uvjetima postoji značajan rizik od isparavanja cijanida iz vodenih sustava u atmosferu, što predstavlja ozbiljnu prijetnju za okoliš i ljudsko zdravlje. Zbog toga se tijekom obrade otpadnih voda koje sadrže cijanid pH održava u alkalnom rasponu (10 – 11) kako bi se stabilizirao ionski oblik i time smanjio rizik od emisije toksičnog cijanovodika. Cijanovodik je bezbojan plin ili tekućina karakterističnog gorkasto-bademastog mirisa [27]. Slobodni cijanid može tvoriti komplekse s 28 različitih metala u raznim oksidacijskim stanjima, pri čemu nastaje više od 70 različitih metalocijanida, većinom anionske prirode [28]. Jednostavni metalni kompleksi lako disociraju u slobodni cijanid pri neutralnom pH. Slabi do srednje jaki kompleksi cijanida disociraju u slobodni cijanid pri pH 4,5, a jaki kompleksi pri pH 2 [29]. Cijanidi također postoje i u drugim oblicima, kao što je tiocijanat te u organskim cijanidima u obliku nitrila [30]. **Slika 2** prikazuje oblike cijanida prisutne u otpadnim vodama.

Prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/20), dopušteno je ispuštanje otpadnih voda u površinske vode s najvišom koncentracijom od 0,5 mg/L ukupnog cijanida te 0,1 mg/L slobodnog cijanida [21].



Slika 2 Oblici cijanida u otpadnim vodama

2.3.1. Prirodni izvori cijanida u vodi i tlu

Cijanidi su sveprisutni, kako u biotskim, tako i abiotskim komponentama ekosustava i njihova uloga u evoluciji života na Zemlji bila je ključna. Važan su izvor dušika za mikroorganizme, gljive i biljke jer sudjeluju u biosintezi aminokiselina, proteina, nukleotida, lipida i staničnih membrana [27]. Neke biljke i mikroorganizmi mogu prirodno sintetizirati cijanid kroz svoje metaboličke procese kao obrambeni mehanizam od štetnika i patogena [17]. Prisutni su i u nekim vrstama kukaca, koji ga sintetiziraju radi kontrole ponašanja pri parenju, poput stonoga, kornjaša i pojedinih leptira. U malim količinama prisutni su i u sjemenkama jabuke, manga, breskve i gorkog badema. Osim toga, poznato je da su i kulture poput bambusa, manioke, pamuka, kukuruza, trešnje, lana, šljive i krumpira prirodno cijanogene [27].

2.3.2. Antropogeni izvori cijanida u vodi i tlu

Ubrzana industrijalizacija rezultirala je značajnim povećanjem količine cijanida u okolišu. Industrije poput koksne, kemijske, petrokemijske, metalurške, automobilske, farmaceutske i proizvodnje čelika generiraju otpadne vode koje sadrže visoke koncentracije cijanidnih kompleksa [17, 27]. S druge strane, upotreba herbicida na bazi nitrila u poljoprivredi doprinose povećanju koncentracije cijanida u tlu [3]. U rudarenju plemenitih metala cijanid služi za

ekstrakciju zlata i srebra [17]. Zlato i srebro plemeniti su metali koji nisu topivi u vodi, no u prisutnosti cijanida stvaraju topive komplekse [26] što istovremeno dovodi do značajnog onečišćenja okoliša obzirom da je za izdvajanje 1,5 kg zlata potreban 1 kg cijanida [17, 28].

2.4. Tiocijanat

Kada mikroorganizmi oksidiraju minerale, sulfidi ili tiosulfati mogu reagirati s cijanidom i stvoriti tiocijanat (SCN^-) koji sadrži ugljik, dušik i sumpor, a koji je umjereno toksičan i kemijski stabilan [31]. U vodenim sustavima najčešće se pojavljuje u strukturama $-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$ i $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$. Dobar je ligand koji lako stvara komplekse s metalima prve prijelazne skupine preko atoma dušika, a s metalima druge i treće prijelazne skupine preko atoma sumpora. U koncentracijskom rasponu od 200 do 1000 mg/L utječe na porast kemijske potrošnje kisika (KPK), koncentracije amonijaka (NH_3) i boju vode, što upućuje na značajno narušavanje kvalitete okoliša. Zbog niže toksičnosti u odnosu na fenol i cijanid, tiocijanat se često zanemaruje u regulatornim okvirima te nije podložan jednakom stupnju nadzora [4]. U Republici Hrvatskoj, prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020), nije propisana maksimalna dopuštena koncentracija za tiocijanat prilikom ispuštanja u površinske vode. Međutim, unutar zakonodavstva EU, Direktiva o industrijskim emisijama propisuje granične vrijednosti emisije za pojedine industrijske sektore pa je tako propisana MDK tiocijanata od 4 mg/L, što se uzima kao referentna emisijska granica za koksnu industriju [32].

2.4.1. Prirodni izvori tiocijanata u vodi i tlu

Prirodni izvori tiocijanata uključuju biljke, biološku i abiotičku razgradnju organske tvari te *in vivo* detoksikaciju cijanida [33]. Prirodni izvori tiocijanata uključuju mlijeko, slinu, urin sisavaca te razgrađujuća biljna tkiva koja sadrže glukozinolate [34]. Tiocijanat također mogu stvarati vodeni organizmi tijekom metaboličke detoksikacije cijanida, primjerice zbog izloženosti industrijskim otpadnim vodama ili putem metabolizma prehrambenih prekursora cijanida, uključujući cijanogene glikozide i nitrile [4].

2.4.2. Antropogeni izvori tiocijanata u vodi i tlu

Tiocijanat je uobičajena komponenta industrijskih otpadnih voda te je prisutan u velikom broju industrijskih sektora, uključujući koksare, metalurgiju, tekstilnu te industriju guma, tiska i boja. Osim što nastaje kao nusprodukt raznih kemijskih procesa, tiocijanat se koristi i kao važna sirovina u kemijskoj industriji, s primjenom u više sektora [4]. Tiocijanati prisutni u tlu, zraku ili vodi potječu prvenstveno iz otpadnih voda koje nastaju tijekom prerade ugljena, ekstrakcije zlata i srebra te rudarskih aktivnosti. Njihovoj prisutnosti u tlu pridonosi i primjena herbicida, insekticida i rodenticida, kao i odlaganje nusproizvoda industrijskih procesa. Oštećena ili raspadajuća biljna tkiva nekih biljaka, poput gorušice, kelja i kupusa, također onečišćuju tlo i vodu tiocijanatom. Amonijev tiocijanat koristi se u formulacijama antibiotika, pesticidima, tekućim raketnim gorivima, ljepilima, fotografskim procesima, za jačanje svile te kao sredstvo za uništavanje korova [27].

2.5. Ekotoksičnost i procjena ekotoksičnosti

Ekotoksičnost podrazumijeva svaku biološku štetu koju kemijska tvar ili njezina smjesa može prouzročiti u živom organizmu, a da je uzrokovana prisutnošću te tvari u okolišu. Budući da je čovjek na vrhu hranidbenog lanca, onečišćenje vodenih i kopnenih ekosustava štetnim tvarima posredno ugrožava i ljudsko zdravlje. Upravo zbog toga, rano otkrivanje i kvantitativna procjena toksičnih učinaka tvari u okolišu predstavlja temelj suvremene zaštite okoliša i upravljanja rizicima [35]. Procjena ekotoksičnosti temelji se na osjetljivim i brzim standardiziranim testovima koji omogućuju kvantifikaciju toksičnih učinaka kemijskih tvari na biološke sustave. Ovi se testovi provode na organizmima koji predstavljaju određeni ekosustav, kako bi se ispitali učinci tvari na njihove biološke osobine. U okviru ekotoksikoloških ispitivanja razlikuju se testovi akutne i kronične toksičnosti. Akutna toksičnost procjenjuje se kratkotrajnim izlaganjem organizama visokim koncentracijama tvari, dok se kronična toksičnost procjenjuje dugotrajnim izlaganjem organizama nižim koncentracijama tvari. Ovisno o eksperimentalnom pristupu, ekotoksičnost se ispituje *in vivo* (na cijelim organizmima) ili *in vitro* (na staničnim i tkivnim kulturama). Rezultati testova izražavaju se pomoću LC₅₀ (engl. *lethal concentration*, koncentracija tvari pri kojoj 50 % populacije testiranih organizama uginu) ili EC₅₀ (engl. *effective concentration*, efektivna koncentracija tvari koja uzrokuje biološki odgovor kod 50 % populacije) vrijednosti. Ove vrijednosti omogućuju usporedbu

toksičnosti različitih tvari i procjenu njihovog utjecaja na ekosustave [36]. Vrijednosti $L(E)C_{50}$ (mg/L) razvrstane su u sedam razina ekotoksikološke opasnosti [19] koje prikazuje **Tablica 2**.

Tablica 2 Sedam razina ekotoksikološke opasnosti razvrstane prema $L(E)C_{50}$ vrijednosti [mg/L]

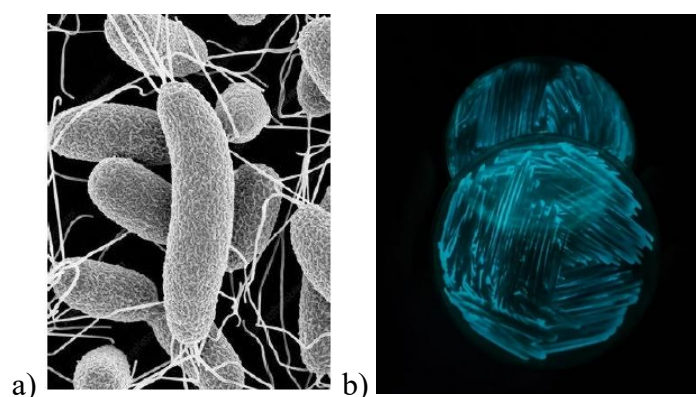
1.	netoksično	$L(E)C_{50} > 1000$
2.	praktički netoksično	$100 < L(E)C_{50} \leq 1000$
3.	blago toksično	$10 < L(E)C_{50} \leq 100$
4.	umjereno toksično	$1 < L(E)C_{50} \leq 10$
5.	jako toksično	$0,1 < L(E)C_{50} \leq 1$
6.	vrlo jako toksično	$0,01 < L(E)C_{50} \leq 0,1$
7.	ekstremno toksično	$L(E)C_{50} \leq 0,01$

U procjeni ekotoksičnosti osobito je važno uzeti u obzir i međudjelovanje različitih tvari koje se često istodobno nalaze u okolišu. Interakcije između dviju ili više kemikalija mogu dovesti do pojačanih ili oslabljenih bioloških učinaka, što klasični pristupi testiranja pojedinačnih tvari često zanemaruju. Ovisno o prirodi međudjelovanja, interakcije se klasificiraju kao aditivne, sinergističke, potencijske ili antagonističke. Aditivna interakcija nastaje kada dvije tvari imaju isti mehanizam djelovanja, a njihov ukupni učinak je zbroj pojedinačnih učinaka. S druge strane, sinergistička interakcija označava situaciju u kojoj je zajednički učinak tvari znatno veći od očekivanog zbroja, što može imati ozbiljne posljedice u ekosustavima izloženima višestrukim onečišćujućim tvarima. Posebno zabrinjavajuće su potencijske interakcije, gdje tvar koja sama po sebi nije toksična pojačava učinak druge tvari, često na neočekivane načine. Antagonističke interakcije, iako manje problematične iz regulatorne perspektive, također mogu mijenjati očekivani profil toksičnosti. Mehanizmi tih interakcija često su kompleksni, uključujući vezanje na receptore, enzime ili transportne sustave, a mogu se odvijati na različitim razinama. Važno je naglasiti da većina mogućih kombinacija tvari još nije sustavno istražena, što povećava nesigurnost u procjeni stvarnog toksičnog rizika u okolišu. Stoga se u ekotoksikološkim studijama sve više naglašava potreba za istraživanjem smjesa i njihove interakcijske dinamike, osobito pri niskim koncentracijama i dugotrajnoj izloženosti. Važnost otkrivanja prisutnosti toksičnih tvari i procjene njihova utjecaja na organizme prepoznata je globalno, što je rezultiralo razvojem različitih metodologija [36].

Ekotoksičnost otpadnih voda predstavlja važan aspekt u procjeni njihovog utjecaja na okoliš, osobito zbog prisutnosti kompleksnih smjesa potencijalno štetnih tvari. Europska komisija i Agencija Sjedinjenih Američkih Država za zaštitu okoliša (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) preporučuju primjenu više testnih organizama iz različitih trofičkih razina kako bi se što pouzdanije procijenila ukupna toksičnost otpadne vode i identificirali prisutni toksični spojevi. Zhao i sur. [8] proveli su testove toksičnosti industrijske otpadne vode na luminiscentnoj bakteriji *Escherichia coli*, zelenoj algi *Pseudokirchneriella subcapitata*, vodenoj leći *Lemna minor*, račiću *Daphnia magna* i embrijima zebrice *Danio rerio*. Rezultati su pokazali da sirova otpadna voda ima znatno višu toksičnost za svih pet testnih organizama u usporedbi s efluentima iz pojedinih faza obrade. Toksičnost otpadne vode nakon uređaja za pročišćavanje bila je znatno niža što ukazuje na zadovoljavajuću učinkovitost obrade.

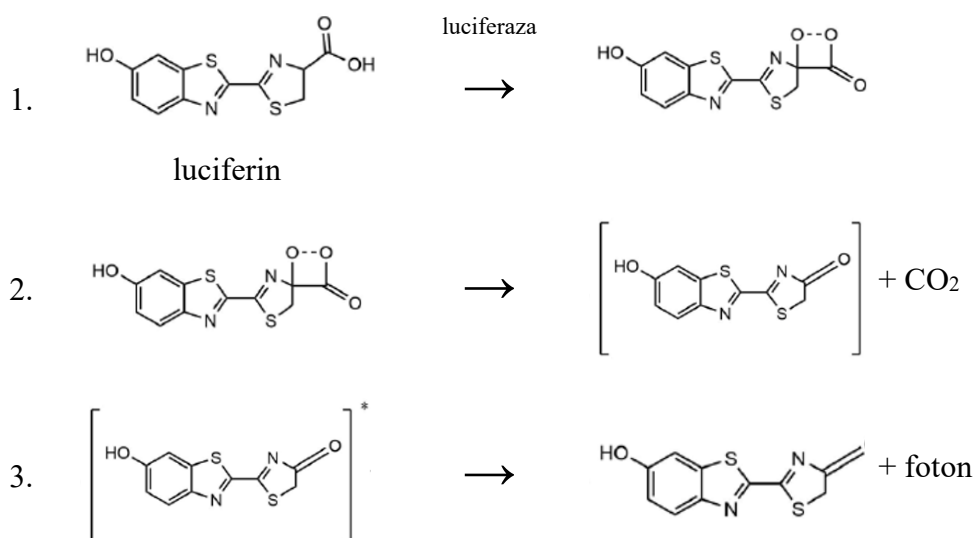
2.5.1. Test toksičnosti s bakterijom *Aliivibrio fischeri*

U testovima toksičnosti najčešće se primjenjuje bioluminiscentna Gram-negativna morska bakterija *Aliivibrio fischeri* (**Slika 3**), ranije poznata kao *Photobacterium phosphoreum* i *Vibrio fischeri* [37]. Ovaj test temelji se na praćenju smanjenja bioluminiscencije bakterije tijekom izloženosti toksičnoj tvari, prema ISO standardu (ISO 11348-3:2007 Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) Part 3: Method using freeze-dried bacteria) [38].



Slika 3 a) *Aliivibrio fischeri* snimljena svjetlosnim elektronskim mikroskopom (SEM) [39] **b)** *Aliivibrio fischeri* uzgojena na hranjivoj podlozi na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

Aliivibrio fischeri prirodno proizvodi svjetlost, a bioluminiscencija joj služi ne samo u ekološkom kontekstu, već i kao način komunikacije među stanicama. U ovom mehanizmu, poznatijem kao *quorum sensing*, bakterijske stanice izlučuju signalne molekule u okoliš, a kada njihova koncentracija prijeđe određeni prag, dolazi do sinkronizirane aktivacije određenih gena, čime se populacija koordinirano prilagođava promjenama u okolišu. *Quorum sensing* prvi je put detaljno opisan upravo kod *Aliivibrio fischeri* i to u okviru simbiotskog odnosa s havajskom kratkorepom lignjom (*Euprymna scolopes*), čiji svjetlosni organ nastanjuje ova bakterija. Emitiranjem svjetlosti *Aliivibrio fischeri* pomaže lignji da prikrije svoju sjenu noću, štiteći je od predatora, dok zauzvrat od domaćina dobiva esencijalne hranjive tvari poput aminokiselina i šećera (29). Svjetlosna emisija nastaje oksidacijom reduciranog flavin-mononukleotida (FMNH₂) koju katalizira enzim luciferaza, te istovremenom oksidacijom dugolančanog alifatskog aldehida. Svjetlosni produkti su oksidirani mononukleotid (FMN) i masna kiselina, koji se zatim ponovno reduciraju u početne spojeve uz visoki energetska trošak (Slika 4).



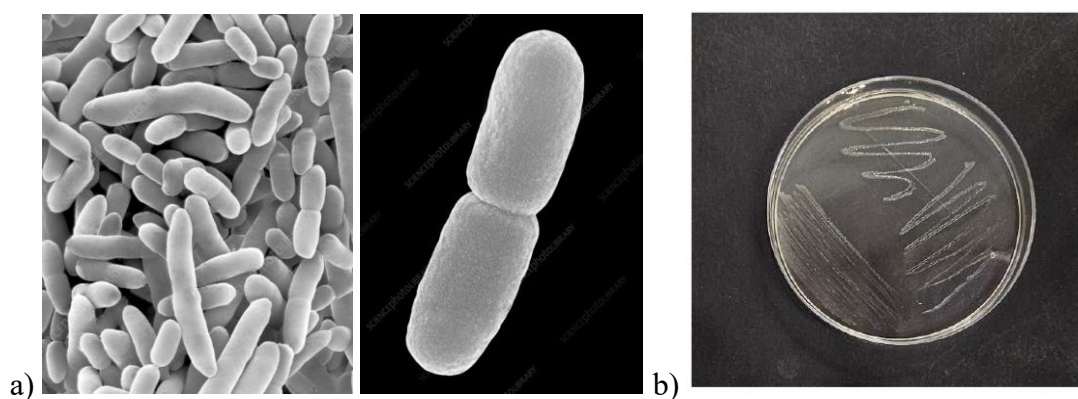
Slika 4 Mehanizam stvaranja svjetlosti kod bioluminiscentnih bakterija

Aktivnost luciferaze može biti smanjena izravnom inhibicijom enzima toksičnom tvari ili smrću bakterijskih stanica. Budući da je smanjenje emisije svjetlosti u svakom slučaju odgovor na ozbiljno oštećenje bakterija, postotak inhibicije luminiscencije služi kao mjera toksičnosti [40]. Krajnja toksičnost mjeri se kao EC₅₀ testnog uzorka koja odgovara gubitku svjetlosti kod 50 % populacije [41]. Zahvaljujući jednostavnosti, kratkom trajanju analize te niskim troškovima, ovaj test postao je jedno od najčešće korištenih sredstava za procjenu akutne i kronične toksičnosti. U usporedbi s klasičnim testovima na vodenim organizmima, poput testova

inhibicije nitrifikacije ili enzimske aktivnosti, ovaj pristup pokazuje izrazitu osjetljivost. Osim toga, *Aliivibrio fischeri* je, u odnosu na druge bioluminiscentne bakterije poput *Pseudomonas fluorescens*, osjetljiviji na niske koncentracije određenih teških metala i organskih onečišćujućih tvari, što dodatno potvrđuje njegovu vrijednost u procjeni ekotoksičnosti [42].

2.5.2. Test toksičnosti s bakterijom *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida (Slika 5) ima važnu ulogu u bioremedijaciji onečišćenih voda i tla. Osim toga, služi i kao testni organizam u ispitivanjima toksičnosti. Standardizirana metoda inhibicije rasta *Pseudomonas putida* opisana je ISO standardom (ISO 10712:1995 Water quality – *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test)) [43] i temelji se na praćenju rasta bakterijske populacije tijekom izloženosti ispitivanoj tvari.



Slika 5 a) *Pseudomonas putida* snimljena SEM-om [44] b) *Pseudomonas putida* izrasla na hranjivoj podlozi na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

Pseudomonas putida je Gram-negativna štapićasta bakterija prosječne duljine 2 do 4 μm koja je široko rasprostranjena u okolišu. Na svojoj vanjskoj površini posjeduje bičeve, koji joj omogućuju pokretanje, te fimbrije, strukturirane izdanke pomoću kojih se veže za površine. Ističe se izraženom metaboličkom raznolikošću te sposobnošću korištenja raznih izvora ugljika, uključujući različite organske spojeve. Ova metabolička fleksibilnost omogućuje bakteriji visoku prilagodljivost te preživljavanje i rast u različitim uvjetima, uključujući i one ekstremne. Optimalni temperaturni raspon za rast bakterije je 25 – 30 $^{\circ}\text{C}$, a u prirodi se uglavnom nalazi u tlu i vodenim ekosustavima. Zbog osjetljivosti na temperature iznad 41 $^{\circ}\text{C}$, njezina prisutnost u

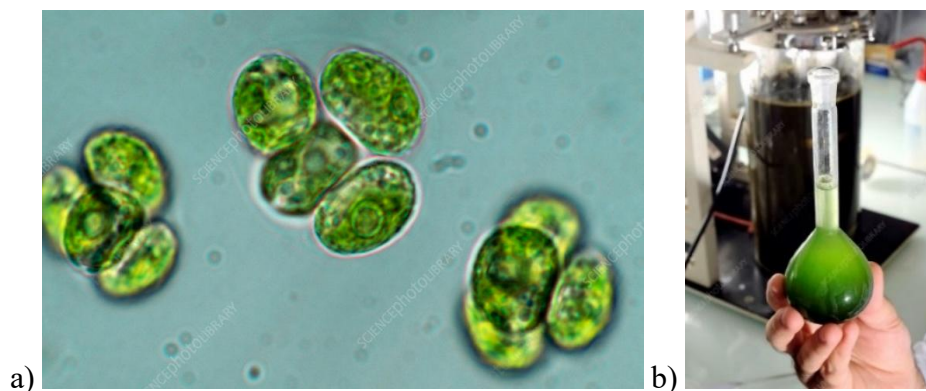
toplijim okolišima je ograničena. Optimalna pH vrijednost za rast iznosi 7 – 8. U laboratorijskim uvjetima bakterija raste kao striktni aerob na različitim supstratima te formira nepravilne kolonije. Ipak, uočena je i sposobnost odstupanja od strogo aerobne prirode, što omogućuje preživljavanje u bioreaktorima bez aeracije [45, 46].

Test toksičnosti s bakterijom *Pseudomonas putida*, uključuje klasično mikrobiološko određivanje broja kolonija izraslih na hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama [47]. Konačni rezultati mogu se prikazati kao postotak inhibicije rasta u odnosu na kontrolu ili kao EC₅₀ vrijednosti, koje označavaju koncentraciju tvari koja uzrokuje 50 % inhibicije [48].

2.5.3. Test toksičnosti s mikroalgom *Chlorella* sp.

Mikroalge su temeljni organizmi vodenih ekosustava zbog svoje ključne uloge primarnih proizvođača. Kao takve, prve su na udaru toksičnih tvari koje se unose u okoliš, a štetni učinci koji se manifestiraju na razini algi mogu se kaskadno prenijeti kroz cijeli trofički lanac, sve do viših organizama. Njihova osjetljivost na različite tvari često je jednaka ili čak veća u odnosu na osjetljivost primarnih i sekundarnih potrošača [25].

Rod *Chlorella* (**Slika 6**) obuhvaća jednostanične zelene mikroalge koje pripadaju razredu *Chlorophyta*. Ove alge su kuglastog oblika, promjera od 2 do 10 µm, i razmnožavaju se isključivo nespolno. U prirodi su vrlo široko rasprostranjene te se mogu naći u slatkovodnim i morskim staništima, ali i na kopnu. Zbog izraženih morfoloških i fizioloških promjena koje pokazuju kao odgovor na okolišne uvjete, njihova taksonomska identifikacija može biti izazovna [49]. Stanična stijenka *Chlorella* sp. sastoji se od polisaharida, proteina i lipida, što osigurava otpornost na vanjske stresore te omogućuje regulaciju osmotskog tlaka i interakcije s okolišem. Unutar stanice nalaze se kloroplasti bogati pigmentom klorofilom, koji omogućuju učinkovitu fotosintezu, ključan proces za proizvodnju organske tvari i kisika. Zahvaljujući visokoj učinkovitosti fotosintetskog sustava, alge roda *Chlorella* proizvode čak do 50 % atmosferskog udjela kisika te pokazuju stope rasta koje nadmašuju one vaskularnih biljaka. Zbog brzog rasta, sposobnosti fotosinteze, jednostavnosti uzgoja, tolerantnosti na širok raspon pH i temperature, kao i sposobnosti prilagodbe različitim okolišnim uvjetima, mikroalga *Chlorella* sp. često se primjenjuje kao modelni organizam u procjeni ekotoksičnosti [50]. Dodatna prednost je i njezina sposobnost akumulacije različitih hranjivih tvari, što je čini pogodnom za bioremedijaciju onečišćenih voda i tla.

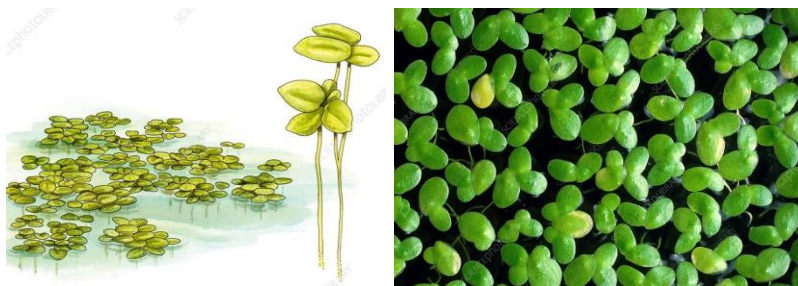


Slika 6 a) *Chlorella* sp. snimljena SEM-om **b)** suspenzija *Chlorella vulgaris* [51]

Toksičnost se procjenjuje metodom inhibicije rasta u skladu s OECD smjernicama (OECD Guideline 201 for the testing of chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test) [52]. Testovi se provode u sterilnim uvjetima, u prisutnosti mineralnog medija i uz stalnu opskrbu mikroalge svjetlom i ugljikovim dioksidom. Slično kao i kod testa s bakterijom *Pseudomonas putida*, fokus je na procjeni inhibicije stanične proliferacije tijekom izlaganja ispitivanoj tvari. Da bi rezultati bili pouzdani, nužno je strogo kontrolirati temperaturu, opskrbu hranjivim solima, pH vrijednost, izbor medija i intenzitet osvjetljenja [53]. Rezultati se obično izražavaju kao EC_{50} vrijednosti, pri čemu se osjetljivost značajno razlikuje među vrstama mikroalgi i ovisi o eksperimentalnim uvjetima ispitivanja.

2.5.4. Test toksičnosti s vodenom lećom *Lemna minor*

Vodene makrofite čine velik udio ukupne biomase u vodenim ekosustavima i imaju ključnu ulogu primarnih proizvođača. Gotovo sve slatkovodne ili bočate površinske vode sadrže predstavnike porodice vodenih leća, a one čine značajan dio ljetne prehrane močvarnih ptica, kao i brojnih beskralješnjaka i kralješnjaka. Ekološki su važne jer svaki negativni utjecaj na njih ima posljedice za održivost cijelog ekosustava. Osim toga, mogu se uzgajati u sterilnim i kontroliranim uvjetima, zbog čega imaju veliku eksperimentalnu vrijednost [54]. Vodene vaskularne biljke iz roda *Lemna* široko su prihvaćene u procjeni ekotoksičnosti. Prednosti *Lemna* sp. uključuju jednostavnu građu, malu veličinu (što omogućuje korištenje malih volumena ispitivane tvari), brz rast, jednostavnost uzgoja i rukovanja, visoku genetsku homogenost (klonovi su morfološki vrlo slični), te osjetljivost na širok spektar onečišćujućih tvari [36]. *Lemna minor* (Slika 7) poznata je i kao obična vodena leća.



Slika 7 *Lemna minor* [55]

U standardiziranom testu toksičnosti, sukladno OECD smjernicama (OECD Guideline 221 for the testing of chemicals: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test) [56], mladim, eksponencijalno rastućim kolonijama *Lemna minor* omogućuje se rast tijekom sedam dana u različitim koncentracijama ispitivane tvari, pri čemu se uspoređuje rast tretiranih biljaka s kontrolnom skupinom. Primarna mjerna varijabla u ovom testu je broj listića, dok se kao dodatne varijable često koriste ukupna površina listića, sadržaj klorofila te svježa ili suha masa biljke. Budući da određene tvari mogu selektivno utjecati na parametre rasta koji nisu broj listića, uključivanje dodatne varijable ključno je za cjelovitu procjenu učinka. Tijekom izlaganja bilježe se promjene u morfologiji biljke, uključujući pojavu kloroze, odnosno požutjelosti listova uslijed smanjenja klorofila, nekroze kao posljedice odumiranja biljnog tkiva, gubitka plovnosti koji može ukazivati na promjene gustoće ili strukture, te zadebljanja kao znak poremećenog rasta. Test se provodi pod strogo kontroliranim uvjetima s pažljivim nadzorom pH i kontaminacije. Svaka testna posuda sadrži 9 do 12 listića. Krajnja točka testa toksičnosti se najčešće izražava kao EC₅₀, odnosno koncentracija tvari koja uzrokuje inhibiciju rasta kod 50 % biljne populacije [56].

2.5.5. Test toksičnosti sa sjemenkama luka *Allium cepa*

Fitotoksičnost znači pojavu različitih štetnih učinaka na biljkama koji nastaju uslijed izloženosti biljke onečišćujućim tvarima iz okoliša. Najčešći uzročnici fitotoksičnosti su sredstva za zaštitu bilja, osobito kada se primjenjuju u prekomjernim količinama. Osim toga, fitotoksične učinke mogu uzrokovati i teški metali, mikroplastika i nanočestice. Fitotoksičnost može biti i posljedica djelovanja toksina koje proizvode pojedine bakterije, gljive ili virusi. Simptomi fitotoksičnosti mogu biti vidljivi i nevidljivi. Vidljivi simptomi uključuju promjene u boji lišća, pojavu nekrotičnih mrlja, usporen ili inhibiran rast, deformacije listova i stabljika, opadanje listova i plodova te sušenje i smežuranost biljnog tkiva. Nevidljivi simptomi uključuju

smanjenu učinkovitost fotosinteze uzrokovan klorozom ili oštećenjem kloroplasta, smanjenu respiratornu aktivnost, inhibiciju enzimskih funkcija i rasta korijena, akumulaciju toksičnih tvari te odumiranje stanica. Pojava fitotoksičnosti ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući vrstu i koncentraciju toksičnih tvari, biološke karakteristike ispitivane biljne vrste, njenu osjetljivost i razvojnu fazu, kao i okolišne uvjete te fizikalno-kemijska svojstva tla [57, 58]. Procjena fitotoksičnih učinaka provodi se različitim metodama, među kojima se najčešće koriste testovi klijavosti, testovi rasta korijena te testovi razvoja sadnica. Ovi testovi omogućuju procjenu potencijalne štetnosti tvari na biljke i identifikaciju sigurnih koncentracija koje ne izazivaju toksične učinke [57, 58]. Test klijavosti sjemena provodi se u skladu s relevantnim OECD smjernicama (OECD Guideline 208 for the testing of chemicals – Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test) [59]. Ovaj test omogućuje procjenu ranih fitotoksičnih učinaka na više biljke tijekom faze klijanja i početnog razvoja sadnica u tlu tretiranom ispitivanom tvari. Testni organizmi izlažu se definiranim koncentracijama ispitivane tvari, a evaluacija učinaka provodi se nakon 14 – 21 dan, tj. nakon što u kontrolnoj skupini dođe do klijanja najmanje 50 % sjemenki. Pri odabiru testnih biljnih vrsta potrebno je uzeti u obzir taksonomsku raznolikost, geografsku distribuciju, osobitosti životnog ciklusa, dostupnost i osjetljivost vrsta [60]. Duljina korijena predstavlja pouzdan pokazatelj toksičnosti ispitivanih tvari te ukupnog rasta i razvoja biljaka. Visoko toksične tvari mogu u potpunosti inhibirati rast ili uzrokovati varijabilnu inhibiciju ovisno o dozi i vremenu izlaganja. Osim smanjenja duljine, izloženost toksičnim tvarima može dovesti i do morfoloških promjena korijena kod *Allium cepa*. Vrijednost toksičnosti izražava se najčešće kao EC₅₀, odnosno koncentracija tvari koja uzrokuje inhibiciju ispitivanog biološkog odgovora kod 50 % populacije, u ovom slučaju duljine korijena [61].

2.6. Toksičnost fenola

O toksičnosti fenola dovoljno govori činjenica da se fenol široko primjenjivao u sterilizaciji kliničkih instrumenata što znači da posjeduje antimikrobna svojstva. Međutim, zbog svoje toksičnosti i korozivnosti danas se više ne koristi za sterilizaciju, osim u vrlo specifičnim, lokaliziranim medicinskim postupcima. Njegova primjena u tu svrhu zamijenjena je sigurnijim i manje toksičnim sredstvima [62]. Fenol može biti smrtonosan ako se proguta, udahne ili apsorbira kroz kožu, jer brzo prodire kroz tkivo i može izazvati tešku iritaciju očiju i dišnog

sustava [18]. Intenzivno izlaganje može oštetiti jetru i bubrege, uzrokovati opekline na koži, drhtavicu, konvulzije [17], pa i rak [63].

Generalno, toksičnost fenola povezana je s hidrofobnošću i stvaranjem slobodnih radikala. Izloženost stanica fenolu u dozi koja inducira toksičnost može uzrokovati strukturne promjene na staničnoj membrani i povećati njezinu propusnost, što dovodi do gubitka vitalnih funkcija organizma [24]. Fenol se ponaša kao protoplazmatski otrov, a njegova amfipatična priroda omogućuje mu lako prodiranje kroz stanične membrane. Unutar stanice može doći do denaturacije proteina i narušavanja membranske stabilnosti, što dodatno pogoršava staničnu homeostazu. Osim izravnog citotoksičnog učinka, fenol može potaknuti stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS), čime doprinosi oksidativnom stresu i oštećenju staničnih komponenti poput lipida, proteina i deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Takvi mehanizmi djelovanja nisu ograničeni na ljude, već su prisutni kod širokog spektra organizama, uključujući alge, biljke i bakterije [64]. Jedan od ključnih razloga opasnosti fenola leži u njegovoj sposobnosti da opstane u okolišu kroz duži vremenski period, nakupljaju se i ima dugoročne toksične učinke na žive organizme, uključujući ljude [62].

Rezultati istraživanja Aruoja i sur. [37] pokazuju da povećanje broja supstituenata na fenolnoj strukturi povećava njegovu hidrofobnost te samim time i toksičnost. Eksperimentalno dobivene EC₅₀ vrijednosti za *Aliivibrio fischeri* bile su 0,37 mg/L za 2,3,5-triklorofenol i 165 mg/L za fenol, dok su za algu *Pseudokirchneriella subcapitata* iznosile 1,43 mg/L za 3,4,5-trikloranilin i 197 mg/L za fenol [37].

Duan i sur. [19] proveli su sveobuhvatan pregled literature fokusirajući se na toksičnost fenola među različitim vodenim organizmima. Fenol nije imao negativan učinak na rast bakterija, dok je za alge bio blago toksičan. Međutim, druga istraživanja pokazala su značajne razine toksičnosti povezane s fenolnim spojevima. EC₅₀ vrijednosti izmjerene su za *Aliivibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) s periodom inkubacije od 5, 15 i 30 minuta i iznosile su 23,28 mg/L, 25,61 mg/L i 26,01 mg/L [41]. Rezultati su u korelaciji s novijim istraživanjem [40]. EC₅₀ vrijednost izmjerena za *Aliivibrio fischeri* s periodom inkubacije 30 min iznosila je 27 mg/L. Duan i sur. [25] primijetili su povećanu osjetljivost morskih algi na fenol u odnosu na slatkovodne alge. Niže EC₅₀ vrijednosti (27,32 mg/L – 92,97 mg/L) zabilježene su za morske alge, dok su više EC₅₀ vrijednosti (126,85 mg/L – 370 mg/L) izmjerene za slatkovodne vrste [25]. Veliki rasponi EC₅₀ vrijednosti ukazuju na značajne razlike u otpornosti na fenol među vrstama. Razlog tomu može biti činjenica da toksičnost određene tvari ovisi o kemijskoj strukturi i bioraspoloživosti za ispitivani organizam. Okolišni čimbenici poput saliniteta, temperature, otopljenog kisika, tvrdoće vode i razvojne faze organizma utječu na toksičnost

fenola za isti organizam, stoga bi ti čimbenici trebali biti standardizirani kako bi se omogućila usporedba dobivenih podataka o toksičnosti [19] te navedeni prilikom prikazivanja EC_{50} vrijednosti kako bi se olakšala usporedba s rezultatima drugih istraživača [41]. Međutim, većina istraživanja ne navodi sve podatke, iako, zbog njihove široke prisutnosti u vodenom okolišu, fenol i fenolni spojevi ubrajaju se među najtemeljitije istraživane skupine toksičnih tvari [65]. **Tablica 3** prikazuje istraživanja toksičnosti fenola na različitim vodenim organizmima.

Tablica 3 Pregled objavljenih istraživanja toksičnosti fenola među različitim vodenim organizmima

organizam	efekt	vrijeme izloženosti	L(E)C ₅₀ [mg/L]	literatura
bakterija				
<i>Aliivibrio fischeri</i>	luminiscencija	15 min	165	[37]
		5 min	22,28	[41]
		15 min	25,61	[41]
		30 min	26,01	[41]
		30 min	27	[40]
		30 min	15,4	[42]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	luminiscencija	72 h	210	[42]
alga				
<i>Chlorella</i> VT-1	smrtnost	96 h	450	[66]
<i>Chlorella vulgaris</i>	inhibicija rasta	96 h	370	[67]
<i>Dunaliella salina</i>	inhibicija rasta	96 h	72,29	[25]
		72 h	155,03	[63]
<i>Platymonas subcordiformis</i>	inhibicija rasta	96 h	92,97	[25]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	inhibicija rasta	96 h	27,32	[25]
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	inhibicija rasta	72 h	19	[37]
<i>Selenastrum capricornutum</i>	inhibicija rasta	96 h	150	[67]
<i>Skeletonema costatum</i>	inhibicija rasta	96 h	27,32	[25]
rak				
<i>Archaeomysis kokuboi</i>	smrtnost	96 h	0,26	[19]
riba				
<i>Cirrhinus mrigala</i>	smrtnost	96 h	1,56	[19]
<i>Labeo rohita</i>	smrtnost	96 h	3212	[68]
vodena biljka				
<i>Polystichum setiferum</i>	inhibicija rasta	24 h	1440	[40]

2.7. Toksičnost cijanida

Prisutnost cijanida u atmosferi može izravno ili neizravno onečistiti tlo, vodu, zrak i sedimente, pri čemu negativno utječu na mikroorganizme, biljke, životinje i čovjeka. Toksičnost cijanida ovisi o vrsti cijanida, a najtoksičniji su slobodni cijanid te cijanidni spojevi ili kompleksi koji mogu osloboditi cijanidni ion. Tijekom Drugog svjetskog rata, cijanovodik je izazvao više smrti nego bilo koji drugi toksin u povijesti [27]. Toksičnost cijanida povezana je s inhibicijom aerobne respiracije zbog vezanja cijanidnog aniona za atom željeza u citokrom c oksidazi, posljednjem enzimu u respiratornom lancu [26]. To vezanje prekida lanac prijenosa elektrona i uzrokuje oštećenje tkiva ovisnih o kisiku [3]. Osim toga, cijanid stvara stabilne komplekse s prijelaznim metalima, narušavajući funkciju proteina [69]. Cijanid kod ljudi u malim dozama uzrokuje simptome poput glavobolje, vrtoglavice, blage dezorijentacije, bolova u trbuhu, mučnine i povraćanja. S druge strane, u visokoj dozi može izazvati respiratornu depresiju, hipotenziju, aritmiju, pa čak i komu [17]. Letalna doza slobodnog cijanida iznosi 1 – 3 mg/kg tjelesne mase ako se proguta ili udahne, a približno 100 mg/kg tjelesne mase ako se apsorbira kroz kožu [28]. Snažne soli cijanida prilikom unosa u ljudski organizam oslobađaju izrazito reaktivne slobodne cijanidne radikale koji se u kiselom pH želuca vežu za vodikove ione i tvore slobodni cijanid koji se onda lako apsorbira u krvotok [30].

U istraživanju AbdelMageeda i ElRakaibyja [2] koncentracija cijanida od 50 mg/L inhibirala je 93 % rasta mikroalge *Chlorella* sp., dok su Liu i suradnici [70] za *Chlorella vulgaris* izmjerili izuzetno nisku EC_{50} vrijednost od 0,14 μ g/L. Naizgled velika razlika između ovih podataka može se pripisati različitim eksperimentalnim uvjetima, sojevima i korištenim metodologijama, no zajedničko im je ukazivanje na visoku osjetljivost zelenih mikroalgi na cijanid. S druge strane, EC_{50} vrijednosti za cijanid značajno su više u slučaju drugih organizama: za komercijalni test s bakterijom *Aliivibrio fischeri* EC_{50} iznosi 1,9 mg/L, za laboratorijske kulture iste vrste 16 mg/L, dok je za spore paprati *Polystichum setiferum* zabilježena EC_{50} vrijednost od 101 mg/L [40]. Ove razlike u toksičnosti u skladu su s očekivanjima, budući da su morske bioluminiscentne bakterije poput *Aliivibrio fischeri* poznate po izrazitoj osjetljivosti na razne onečišćujuće tvari, dok je akutna fitotoksičnost kod viših biljaka u pravilu slabije izražena. Takvi rezultati potvrđuju važnost upotrebe više trofičkih razina i testnih organizama prilikom procjene ekotoksičnosti, kako bi se obuhvatile različite osjetljivosti i ekološke funkcije unutar ekosustava. **Tablica 4** prikazuje pregled istraživanja toksičnosti cijanida za različite vodene organizme.

Tablica 4 Pregled objavljenih istraživanja toksičnosti cijanida među različitim vodenim organizmima

organizam	efekt	vrijeme izloženosti	L(E)C ₅₀ [mg/L]	literatura
bakterija				
<i>Aliivibrio fischeri</i>	bioluminiscencija	20 min	1,9	[40]
alga				
<i>Chlorella vulgaris</i>	inhibicija rasta	27 h	0,0001	[70]
<i>Desmarestia viridis</i>	inhibicija rasta	48 h	0,93	[71]
	inhibicija rasta	72 h	1,52	[71]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	inhibicija rasta	48 h	1,54	[71]
	inhibicija rasta	72 h	5,23	[71]
vodena biljka				
<i>Polystichum setiferum</i>	inhibicija rasta	24 h	101	[40]

2.8. Toksičnost tiocijanata

Iako je tiocijanat približno sedam puta manje toksičan od cijanida, njegova prisutnost u okolišu i dalje može imati značajne štetne učinke na ekosustave i ljudsko zdravlje, osobito pri koncentracijama koje premašuju ekološki i zdravstveno prihvatljive pragove. Tiocijanat djeluje kao nekompetitivni inhibitor, remeteći niz enzimskih reakcija kroz vezanje za proteinske strukture, što može dovesti do narušavanja fizioloških funkcija kod različitih organizama. Toksičnost tiocijanata prepoznata je još u ranim fazama istraživanja, a dokumentirani su štetni učinci na ljude, druge sisavce, biljke, vodene organizme i enzimske sustave. Njegov visoki afinitet prema proteinima doprinosi akumulaciji i toksičnom djelovanju, uključujući smetnje u proteinskoj dijalizi, kao i neurotoksične učinke poput vrtoglavice i, u težim slučajevima, kome. Nadalje, zbog blokade prijenosa halogenih iona u štitnjaču, kronična izloženost visokim koncentracijama tiocijanata može rezultirati gušavošću te izraženim antitiroidnim učinkom [4, 72]. Kritična koncentracija tiocijanata u ljudskoj krvi iznosi približno 150 mg/mL [34]. U istraživanju AbdelMageeda i ElRakaibyja [2] ispitan je učinak cijanida i tiocijanata na rast mikroalge *Chlorella* sp.. Pokazano je da je cijanid toksičniji, pri čemu je koncentracija od 50 mg/L inhibirala 93 % rasta, dok je tiocijanat pri znatno višoj koncentraciji (5000 mg/L) uzrokovao tek oko 75 % inhibicije. Mješavina tih i drugih ispitanih onečišćujućih tvari dovela je do 96 % inhibicije rasta mikroalge, što ukazuje na aditivni učinak smjese. Jedna od rijetkih

detaljno opisanih studija toksičnosti tiocijanata na višim vodenim organizmima uključuje istraživanje akutne toksičnosti na pastrvama (*Salvelinus fontinalis*, *Salmo gairdneri*), pri čemu je zabilježena njihova sposobnost aktivne akumulacije tiocijanata u plazmi, ovisno o koncentraciji u vodi, veličini jedinke i ionskom sastavu medija. Pokazano je da tiocijanat ulazi u organizam zamjenjujući klorid, čime se narušava elektrolitna ravnoteža. Osim izravne toksičnosti, autori su detektirali i endogenu konverziju tiocijanata u cijanid, što dodatno povećava rizik od sistemske toksičnosti. Posebno značajan nalaz bio je razvoj sindroma iznenadne smrti (engl. *sudden death syndrome*, SDS) pri plazmatskim koncentracijama od oko 250 mg/L tiocijanata, uz simptome poput konvulzija, gubitka ravnoteže i zastoja disanja, što ukazuje na potencijalno djelovanje tiocijanata na neuromuskularnu funkciju [73]. U studiji provedenoj na *Daphnia magna*, pokazano je da okolišni uvjeti značajno moduliraju toksičnost tiocijanata. Porast temperature s 8 na 16 °C doveo je do višestrukog povećanja toksičnosti, osobito pri neutralnom pH, dok je povećanje pH s 5 na 7 rezultiralo smanjenjem štetnih učinaka. Najtoksičnija kombinacija utvrđena je pri pH 5 i temperaturi 16 °C [74]. Sličan utjecaj pH zabilježen je i u 96 h testovima na mlađi pastrve (*Salmo gairdneri*), gdje je toksičnost tiocijanata bila viša pri nižem pH. Utjecaj temperature bio je manje izražen u usporedbi s rezultatima na *Daphnia magna*. LC₅₀ vrijednosti za tiocijanat kretale su se u rasponu od 177 do 264 mg/L, ovisno o kombinaciji pH i temperature [75].

2.9. Matematički modeli u procjeni toksičnosti smjesa

Onečišćujuće tvari u vodi rijetko se nalaze pojedinačno, već uglavnom u smjesama u različitim omjerima. Eksperimentalno određivanje toksičnosti svake pojedine smjese skupo je i nepraktično. Jednom kad se razviju, matematički modeli omogućuju predviđanje toksičnosti smjesa u kratkom vremenu i bez dodatne potrošnje kemikalija. Osim toga, matematički modeli omogućuju uvid u način zajedničkog djelovanja tvari unutar smjese te njihovu ukupnu toksičnost na ispitivane organizme [76].

Procjena toksičnosti smjesa predstavlja sve veći izazov u ekotoksikologiji. Najzastupljeniji među dostupnim modelima su model koncentracijske adicije (engl. *Concentration Addition*, CA) i model neovisnog djelovanja (engl. *Independent Action*, IA). Model koncentracijske adicije temelji se na pretpostavci da komponente smjese djeluju putem istog mehanizma toksičnosti te da se njihov učinak može zbrajati. S druge strane, model neovisnog djelovanja polazi od ideje da svaka komponenta djeluje neovisno i različitim mehanizmom, a ukupni

učinak predstavlja kombinaciju pojedinačnih odgovora. Iako su oba modela korisna kao početne aproksimacije, često ne uspijevaju točno predvidjeti stvarni biološki odgovor jer zanemaruju međusobne interakcije među spojevima. Te interakcije, toksodinamičke i toksokinetičke prirode, mogu uključivati promjene u dostupnosti, apsorpciji, metabolizmu ili osjetljivosti organizma na jednu tvar zbog prisutnosti druge. Kao posljedica mogu se javiti sinergistički učinci, pri čemu je toksičnost smjese veća od očekivane, ili antagonistički učinci, kada se ukupna toksičnost smanjuje. Upravo priroda i intenzitet tih interakcija predstavljaju najveći izazov u modeliranju smjesa, budući da mogu varirati od zanemarivih do izrazito snažnih i nepredvidivih učinaka [77].

2.9.1. Model koncentracijske adicije

Jedan od najranije razvijenih i najčešće primjenjivanih pristupa u modeliranju toksičnosti smjesa je model koncentracijske adicije koji su prvi predložili Leowe i Muischnek [78]. Ovaj model polazi od pretpostavke da sve komponente u smjesi dijele sličan ili isti mehanizam djelovanja te da njihova toksičnost predstavlja osnovni diferencirajući čimbenik. U osnovi, ovaj model pretpostavlja da se jednaki biološki učinak može postići zamjenom jedne komponente proporcionalnom količinom druge, što znači da tvari unutar smjese djeluju kao međusobni razrjeđivači. Takva aditivnost omogućuje proračun ukupnog učinka na temelju poznatih individualnih toksičnosti, bez potrebe za dodatnim eksperimentalnim mjerenjima. Matematički, model koncentracijske adicije izražava se jednadžbom (1):

$$EC_{50,MIX} = \left(\sum_i \frac{x_i}{EC_{50,i}} \right)^{-1} \quad (1)$$

gdje je

- $EC_{50,MIX}$ efektivna koncentracija smjese koja uzrokuje biološki odgovor kod 50 % populacije,
- $EC_{50,i}$ efektivna koncentracija komponente kada se primjenjuje samostalno koja uzrokuje biološki odgovor kod 50 % populacije,
- x_i množinski udio komponente u smjesi.

2.9.2. Model neovisnog djelovanja

Model neovisnog djelovanja temelji se na pretpostavci da svaka komponenta smjese djeluje zasebno i putem različitog mehanizma toksičnosti. Izvorno je razvijen u kontekstu eksperimenata koji mjere postotak smrtnosti u testnoj populaciji. Za binarnu smjesu dviju tvari koje djeluju neovisno, vjerojatnost preživljavanja populacije prikazuje se jednačbom (2):

$$P_{Smix}(c_{mix}) = P_{S1}(c_1) \times P_{S2}(c_2) \quad (2)$$

gdje je

- $P_{Smix}(c_{mix})$ ukupna vjerojatnost da organizam preživi izloženost smjesi pri koncentraciji smjese c_{mix} ,
- $P_{S1}(c_1)$ vjerojatnost da organizam preživi izloženost prvoj komponenti smjese, pri koncentraciji c_1 ,
- $P_{S2}(c_2)$ vjerojatnost da organizam preživi izloženost drugoj komponenti smjese, pri koncentraciji c_2 .

Budući da se u ekotoksikologiji češće promatra vjerojatnost smrtnosti testnog organizma nego vjerojatnost preživljavanja, model neovisnog djelovanja često se izražava pomoću vjerojatnosti smrtnosti prikazane jednačbom (3):

$$P_{Dmix}(c_{mix}) = 1 - P_{Smix}(c_{mix}) \quad (3)$$

odnosno jednačbom (4):

$$P_{Dmix}(c_{mix}) = 1 - [1 - P_{D1}(c_1)] \times [1 - P_{D2}(c_2)] \quad (4)$$

gdje je

- $P_{Dmix}(c_{mix})$ ukupna vjerojatnost smrtnosti organizma prilikom izloženost smjesi pri koncentraciji smjese c_{mix} , a
- $P_{D1}(c_1)$ vjerojatnost smrtnosti organizma prilikom izloženosti prvoj komponenti smjese, pri koncentraciji c_1 ,
- $P_{D2}(c_2)$ vjerojatnost smrtnosti organizma prilikom izloženosti drugoj komponenti smjese, pri koncentraciji c_2 .

Za n-komponentne smjese, model neovisnog djelovanja općenito se može prikazati jednačbom (5):

$$P_{D,mix}(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - P_{D,i}(c_i)] \quad (5)$$

gdje je

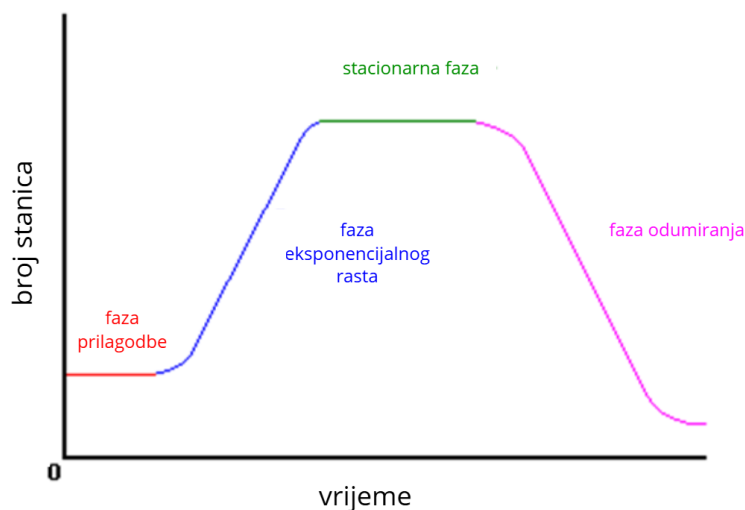
- $P_{D,i}(c_i)$ vjerojatnost smrtnosti organizma prilikom izloženosti komponenti smjese i , pri koncentraciji c_i .

Ovom jednadžbom model neovisnog djelovanja omogućuje procjenu ukupne toksičnosti višekomponentnih smjesa, pri čemu se pretpostavlja da svaka komponenta doprinosi ukupnom učinku neovisno o ostalima.

2.10. Biorazgradnja

Biorazgradnja podrazumijeva razgradnju toksičnih tvari u manje štetne produkte djelovanjem mikroorganizama ili njihovih enzima. Zahvaljujući sposobnosti prilagodbe i rasta u prisutnosti onečišćujućih tvari, određeni mikroorganizmi mogu učinkovito razgraditi onečišćujuće tvari, što ih čini pogodnim za primjenu u biološkim postupcima uklanjanja. Takvi postupci predstavljaju ekološki prihvatljivu i isplativu alternativu konvencionalnim metodama, uz minimalan negativan utjecaj na okoliš [27].

Proces biorazgradnje često je usko povezan s rastom mikroorganizama, pri čemu se intenzitet razgradnje mijenja kroz različite faze tipične krivulje mikrobnog rasta (**Slika 8**). Faza prilagodbe (*Lag Phase*) označava početno razdoblje bez vidljivog rasta, tijekom kojeg mikroorganizmi prilagođavaju svoj metabolički aparat novim uvjetima i dostupnim supstratima. Slijedi faza eksponencijalnog rasta (*Log Phase*), u kojoj dolazi do naglog povećanja broja stanica i intenzivne razgradnje ciljanih tvari. Nakon toga nastupa stacionarna faza (*Stationary Phase*), u kojoj se brzina rasta usporava zbog iscrpljenja hranjivih tvari i nakupljanja toksičnih produkata. U završnoj fazi odumiranja (*Death Phase*) broj živih stanica postupno opada, a biorazgradnja prestaje ili postaje zanemariva [79].



Slika 8 Krivulja rasta mikroorganizama [80]

2.10.1. Optimizacija procesa biorazgradnje

U optimizaciji procesa, posebno onih koji uključuju više varijabli, sve se češće primjenjuju statistički alati kao što su planiranje pokusa (engl. *Design of Experiment*, DoE) i metodologija odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*, RSM). DoE je eksperimentalna strategija usmjerena na prikupljanje empirijskih podataka, odnosno informacija temeljenih na analizi stvarnih eksperimentalnih rezultata, a ne samo na teorijskim pretpostavkama. Takav pristup omogućuje bolje razumijevanje međudjelovanja između više varijabli i njihova utjecaja na učinkovitost procesa. DoE tehnike nude učinkovit način oblikovanja eksperimentalnih uvjeta s ciljem dobivanja robusnih i informativnih skupova podataka, uz smanjenje ukupnog broja pokusa. Za razliku od tradicionalnog pristupa u kojem se ispituje jedan po jedan čimbenik, DoE i RSM omogućuju istovremeno ispitivanje više varijabli i njihovih međudjelovanja. Time se ne samo smanjuje broj potrebnih pokusa, već se poboljšava i točnost zaključaka o utjecaju pojedinih i kombiniranih faktora na ispitivani odziv. U ovom kontekstu, DoE omogućuje sustavno planiranje pokusa i identifikaciju ključnih varijabli koje utječu na učinkovitost procesa biorazgradnje. Osim toga, omogućuje optimizaciju eksperimentalnih uvjeta s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti. RSM se nadovezuje na ovaj pristup te se koristi za modeliranje i kvantitativnu analizu odnosa između ulaznih varijabli i odziva, uzimajući u obzir njihove pojedinačne i međusobne učinke [81–83].

Jedan od često korištenih pristupa unutar RSM-a je *Full Factorial* dizajn (FFD), koji se temelji na ispitivanju kombinacija više varijabli na više razina. Primjerice, dizajn 3^3 uključuje tri varijable na tri razine i rezultira s 27 eksperimentalnih uvjeta. Ovakav pristup omogućuje

iscrpnju procjenu svih mogućih interakcija među varijablama. Rezultat dizajna eksperimenta je matematički model koji opisuje odnos između ulaznih varijabli i odziva. Da bi se provjerila njegova statistička značajnost i prikladnost, koriste se metode statističke analize, od kojih je analiza varijance (ANOVA) najzastupljenija, osobito kod eksperimenata s više od dva uzorka. ANOVA omogućuje procjenu utjecaja jedne ili više nezavisnih varijabli na jednu zavisnu varijablu, na temelju usporedbe srednjih vrijednosti [81–83].

Statistička evaluacija modela ANOVA metodom uključuje nekoliko ključnih pokazatelja:

- Standardna devijacija (SD): predstavlja prosječno kvadratno odstupanje pojedinačnih rezultata od srednje vrijednosti. Manja SD ukazuje na veću točnost modela.
- Koeficijent varijacije (CV): izražava SD kao postotak srednje vrijednosti i prikazuje relativnu raspršenost podataka.
- Koeficijent determinacije (R^2): pokazuje koliki dio ukupne varijabilnosti odziva objašnjava model.
- Prilagođeni R^2 : uzima u obzir broj uključenih varijabli u model, dok predviđeni R^2 mjeri sposobnost modela da predvidi nove, nezavisne podatke. Idealno je da razlika između prilagođenog i predviđenog R^2 ne prelazi 0,2; veće razlike upućuju na probleme u modelu, poput netipičnih vrijednosti.
- Adekvatna preciznost: odnosi se na omjer između dometa predviđenih vrijednosti i srednje pogreške predviđanja. Vrijednost veća od 4 ukazuje na zadovoljavajuću diskriminacijsku sposobnost modela [81–83].

Iako se DoE i RSM alati sve češće koriste u optimizaciji biorazgradnje pojedinačnih tvari, u dostupnoj literaturi nisu pronađeni pregledni radovi koji se bave primjenom tih alata za optimizaciju biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata, što ovu temu čini osobito aktualnom i znanstveno relevantnom.

2.10.2. Biorazgradnja fenola

Zbog stabilnosti aromatskog prstena, fenoli se smatraju otpornima na biorazgradnju, a supstituirani fenoli, osobito halogenirani fenoli, još se teže biološki razgrađuju. Unatoč tome, određeni mikroorganizmi razvili su sposobnost toleriranja toksičnosti fenola, a neki ga mogu koristiti kao izvor energije i ugljika. Biorazgradnja podrazumijeva potpunu mineralizaciju fenola u ugljikov dioksid, vodu i neopasne krajnje produkte za koju je sposobna raznolika skupina mikroorganizama; bakterije, mikroalge, kvasci te plijesni [20].

Pregled dosadašnjih istraživanja ukazuje na činjenicu da biorazgradnja fenola nije isključivo određena prisutnošću aktivnog mikroorganizma, već i nizom različitih čimbenika uključujući kemijsku strukturu fenola, metabolički kapacitet organizma, specifičnost enzima, pH, temperaturu, salinitet i prisutnost dodatnih izvora ugljika i dušika [18]. Ipak, učinkovitost biorazgradnje fenola uvelike ovisi o njegovoj početnoj koncentraciji. U nižem koncentracijskom rasponu fenol djeluje kao izvor ugljika i energije, pa se specifična stopa rasta mikroorganizama povećava s porastom koncentracije supstrata. Pritom se poboljšava i brzina biorazgradnje. Međutim, nakon postizanja određene granične koncentracije, daljnji porast koncentracije fenola dovodi do smanjenja stope rasta. Ova pojava poznata je kao inhibicija supstratom, a posljedica je toksičnih učinaka fenola na stanice, uključujući oštećenje membrana i narušavanje staničnih funkcija. Biorazgradnja tada više ne slijedi jednostavan uzlazni trend, već pokazuje karakterističan uzorak s vršnom točkom nakon koje dolazi do opadanja učinkovitosti [84]. U skladu s modelima koji opisuju ovisnost stope rasta o koncentraciji supstrata, eksperimentalna opažanja dodatno potvrđuju da visoke koncentracije fenola negativno utječu na mikrobnu aktivnost [1, 87]. Chatterje i Das [1] dokazali su da se porastom koncentracije fenola produljuje lag faza rasta bakterija, a učinkovitost biorazgradnje pada pri višim koncentracijama fenola zbog njegovog toksičnog djelovanja na stanične membrane [1]. Kod primjene tehnologije aktivnog mulja, potvrđeno je da pri višim koncentracijama (≥ 1500 mg/L) dolazi do nakupljanja fenola u mediju i inhibicije mikrobiološke aktivnosti, dok se vrijeme potrebno za potpunu razgradnju proporcionalno povećava s koncentracijom [87].

U kontekstu biorazgradnje fenola, bakterije izolirane iz onečišćenog okoliša najviše su istraživane [1, 79, 88–90] zbog njihove prilagodljivosti i raznolikih mehanizama detoksikacije. Osim koncentracije, i okolišni uvjeti poput pH i temperature snažno utječu na ishod biorazgradnje fenola bakterijama. Neki sojevi poput *Bacillus badius* pokazuju najveću učinkovitost pri alkalnom pH i temperaturama između 30 i 35 °C što upućuje na važnost optimizacije uvjeta za biorazgradnju [18].

Mikroalge, iako osjetljivije na fenol od bakterija, mogu pridonijeti njegovoj razgradnji u vodenom okolišu. Ipak, njihova tolerancija na fenol je niska, a granica između koncentracija koje potiču razgradnju i onih koje izazivaju toksičnost vrlo je tanka [91, 92]. Optimalni uvjeti rasta ovise o vrsti, no općenito uključuju temperature između 28 i 35 °C i neutralni pH [93]. Istraživanja sugeriraju da svjetlost može pozitivno utjecati na biorazgradnju fenola mikroalgama, no iznad određene razine intenziteta dolazi do fotoinhibicije i smanjene produktivnosti [94]. S druge strane, pokazano je i da je u nekim slučajevima, poput

biorazgradnje fenola iz otpadnih voda maslinarstva, učinkovitost mikroalgi veća u tamnim uvjetima zbog smanjenja oksidacijskog stresa izazvanog svjetlom [95].

Kvasci i plijesni također pokazuju potencijal za biorazgradnju fenola, osobito u ekstremnijim uvjetima. Psihrotolerantni kvasci poput *Candida subhashii* i *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* uspješno razgrađuju fenol na nižim temperaturama [6], dok su drugi sojevi, primjerice *Candida tropicalis* i *Trichosporon montevideense*, sposobni učinkovito razgraditi i vrlo visoke koncentracije fenola [96, 97]. Plijesni, poput *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta, pokazale su povećanu učinkovitost biorazgradnje fenola nakon imobilizacije stanica ili mutagenih tretmana, što ukazuje na mogućnosti unaprjeđenja njihove sposobnosti razgradnje biotehnološkim pristupima [98]. Također, gljiva *Trametes versicolor* demonstrirala je sposobnost progresivne biorazgradnje fenola u farmaceutskoj otpadnoj vodi, s postupnim porastom učinkovitosti kroz nekoliko dana [99].

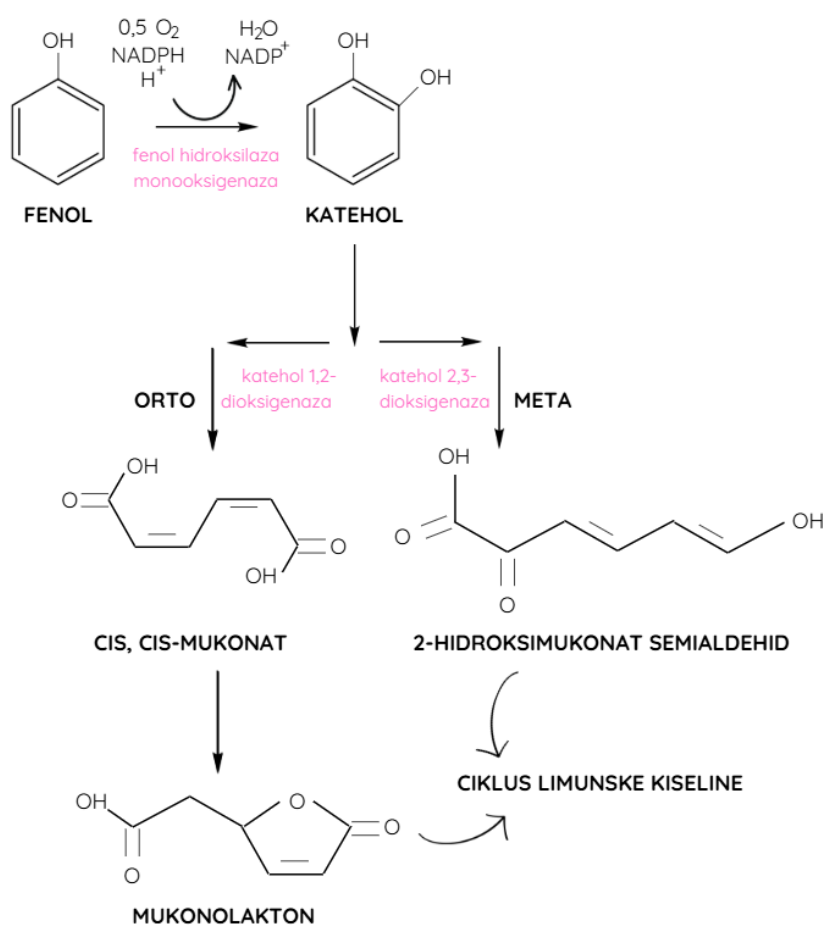
S obzirom na veliku raznolikost mikroorganizama i osjetljivost procesa na okolišne čimbenike, optimizacija biorazgradnje fenola zahtijeva pažljiv odabir organizma, sustava obrade i uvjeta procesa. **Tablica 5** sažima relevantna istraživanja koja prikazuju sposobnost različitih mikroorganizama za razgradnju fenola, uzimajući u obzir varijacije u uvjetima kultivacije i početnim koncentracijama supstrata.

Tablica 5 Prikaz učinkovitosti biorazgradnje fenola različitim mikroorganizmima. Parametri uključuju početnu koncentraciju fenola (γ , mg/L), postotnu učinkovitost razgradnje (X , %), vrijeme potrebno za razgradnju (t , h) i temperaturu provođenja eksperimenta (T , °C)

	mikroorganizam	γ	X	t	pH	T	literatura
		mg/L	%	h	-	°C	
BAKTERIJE	<i>Acinetobacter</i> sp. SA01	1000	100	60	7	30	[100]
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PA	800	92	48	8	30	[88]
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PA	1700	46	48	8	30	[88]
	<i>Bacillus badius</i>	420	98	48	9	37	[18]
	<i>Bacillus badius</i>	1680	70	48	9	37	[18]
	<i>Bacillus pumilus</i>	50	84	48	7	37	[1]
	<i>Bacillus pumilus</i>	100	100	48	7	35-37	[1]
	<i>Bacillus subtilis</i>	500	100	36	7	35	[84]
	<i>Pseudomonas</i> sp.	700	100	60	7	35	[84]
	<i>Pseudomonas</i> sp. AQ5-04	5	98	36	7	30	[89]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	400	99	24	7	35	[84]
	<i>Rhodococcus</i> sp.	500	89	21	7,4	30	[90]
	<i>Rhodococcus</i> sp. SKC	500	67	42	7	30	[79]
	<i>Rhodococcus</i> sp. SKC	500	17	42	5	30	[79]
MIKROALGE	<i>Chlorella</i> sp.	700	87	192	7	28	[92]
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	200	100	216	-	-	[101]
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1000	55	120	6,2	25	[95]
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1000	42	120	6,2	25	[95]
KVASCI	<i>Candida oregonensis</i>	750	100	48	6	18	[6]
	<i>Candida subhashii</i>	1000	100	48	6	18	[6]
	<i>Candida tropicalis</i>	2000	100	66	6	30	[96]
	<i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i>	1000	100	48	6	18	[6]
	<i>Trichosporon montevidense</i> PHE1	1200	99,5	18	-	30	[97]
PLIJESNI	<i>Aspergillus niger</i>	100	28	-	-	-	[98]
	<i>Aspergillus terreus</i>	100	17	-	-	-	[98]
	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100	13	-	-	-	[98]
	<i>Trametes versicolor</i>	420	93	168	5,5	25	[99]

2.10.2.1. Mehanizam aerobne biorazgradnje fenola

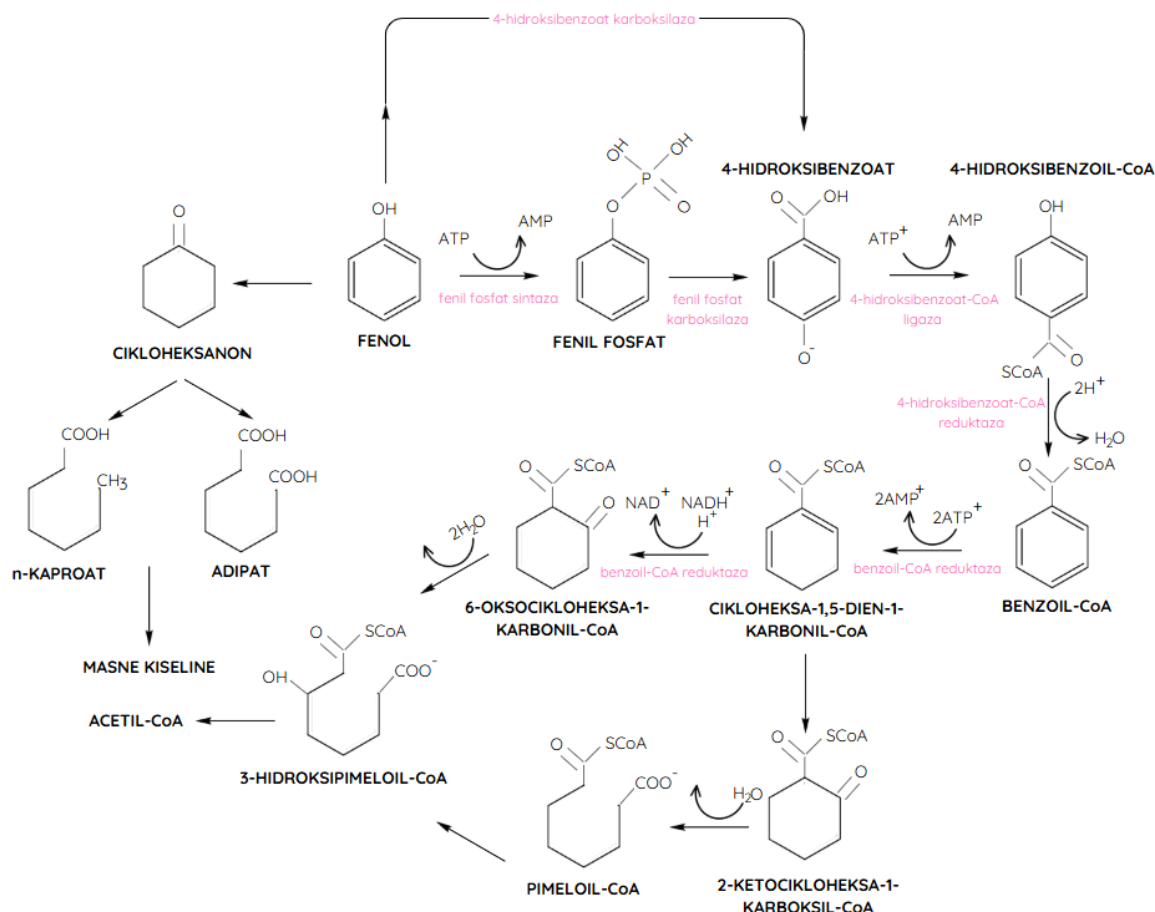
U slučaju fenola, aerobni procesi uklanjanja temeljito su istraženi i pokazali su dobre rezultate (23). U aerobnim uvjetima, biorazgradnja fenola započinje hidroksilacijom aromatskog prstena, tj. vezanjem hidroksilne skupine na *orto* položaj benzenskog prstena uz enzim fenol hidroksilaza monooksigenaza kako bi se formirao univerzalni metabolit, katehol. Ovisno o odgovornom mikroorganizmu, katehol se podvrgava cijepanju prstena na *orto* ili *meta* položaju. *Orto* put razgradnje aromatskog prstena katalizira enzim katehol 1,2-dioksigenaza koji sadrži željezov (III) ion (Fe^{3+}) kao prostetičku skupinu te generira cis,cis-mukonat. Kasnije, metaboliti ulaze u ciklus limunske kiseline radi potpune razgradnje fenola. S druge strane, *meta* put razgradnje katalizira enzim katehol 2,3-dioksigenaza, koji sadrži željezov (II) ion (Fe^{2+}) kao prostetičku skupinu te generira 2-hidroksimukonat semialdehid, koji se također dalje metabolizira u ciklusu limunske kiseline [100]. **Slika 9** shematski prikazuje glavne puteve aerobne biorazgradnje fenola, uključujući stvaranje katehola i njegovu daljnju razgradnju *orto* i *meta* putem.



Slika 9 Shematski prikaz biorazgradnje fenola preko katehola *orto* i *meta* putem

2.10.2.2. **Mehanizam anaerobne biorazgradnje fenola**

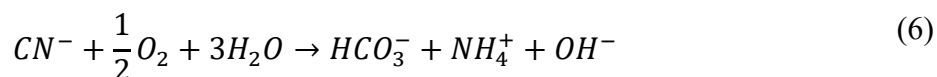
Anaerobni mikroorganizmi osjetljiviji su na fenolna opterećenja u usporedbi s njihovim aerobnim ekvivalentima. Osim toga, anaeroban proces biorazgradnje fenola kompleksniji je i manje stabilan od aerobnog. Anaerobna biorazgradnja fenola započinje karboksilacijom fenola u 4-hidroksibenzoat koja se može odviti direktno ili u dva stupnja. Direktna karboksilacija moguća je kod strogih anaeroba uz enzim 4-hidroksibenzoat karboksilazu. Kod dvostupanjskog puta, fenolu se u prvom koraku dodaje fosfatna skupina iz nepoznatog donora, što katalizira enzim fenil fosfat sintaza, a prilikom čega nastaje fenil fosfat. U drugom koraku slijedi formiranje 4-hidroksibenzoata procesom karboksilacije fenil fosfata, što katalizira enzim fenil fosfat karboksilaza koji zahtijeva prisutnost mangana. Nadalje, 4-hidroksibenzoat-CoA ligaza zatim prenosi CoA na 4-hidroksibenzoat, tvoreći 4-hidroksibenzoil-CoA. Ovaj se smanjuje dehidroksilacijom do benzoil-CoA, koji je zajednički međuprodukt u metabolizmu mnogih aromatskih spojeva, uz pomoć 4-hidroksibenzoil-CoA reduktaze. Benzoil-CoA se reduktivno dearomatizira do cikloheksa-1,5-dien-1-karbonil-CoA. Dearomatizaciju katalizira benzoil-CoA reduktaza. Sekvence gena za enzim benzoil-CoA reduktaza pronađene su kod većine fakultativnih anaeroba koji razgrađuju aromatične spojeve. Konačno, cikloheksa-1,5-dien-1-karbonil-CoA može se podvrgnuti razdvajanju aromatskog prstena na dva načina. Prvi, hidratizacijom cikloheksa-1,5-dien-1-karbonil-CoA u 6-hidroksicikloheksa-1-en-1-karbonil-CoA i redukcijom u 6-okso-cikloheksa-1-karbonil-CoA. Zatim se prsten otvara hidrolazom do 3-hidroksipimeloil-CoA. U drugom načinu, cikloheks-1-en-1-karboksil-CoA hidratizira se, a zatim reducira u 2-ketocikloheksa-1-karboksil-CoA. Prsten se potom hidrolizira kako bi se formirao pimeloil-CoA, koji se zatim reducira i hidratizira do 3-hidroksipimeloil-CoA. Oba puta nastavljaju s degradacijom do acetil-CoA i ugljikova dioksida. Postoji i alternativni put anaerobne biorazgradnje fenola, ali je i dalje relativno nepoznat jer brze stope razgradnje ometa nakupljanje međuprodukata, što sprječava detaljna istraživanja. Poznato je da se alternativni put događa pod termofilnim uvjetima, dok se prethodno spomenuti put uglavnom odvija pod mezofilnim uvjetima, ali je također moguć i pod termofilnim uvjetima. Fenol se najprije reducira u cikloheksanon u prisutnosti nitrata, a zatim u n-kaproat. N-kaproat se zatim oksidira do masnih kiselina. Mikrobne zajednice uključene u termofilnu razgradnju još uvijek nisu potpuno okarakterizirane i identificirane [65]. **Slika 10** prikazuje mehanizam anaerobne biorazgradnje fenola.



Slika 10 Mehanizam anaerobne biorazgradnje fenola

2.10.3. Biorazgradnja cijanida

Cijanidi poput cijanovodika, metalnih kompleksa cijanida i tiocijanata izvor su dušika mnogim mikroorganizmima [26]. Nekoliko vrsta bakterija, algi, gljiva, biljaka i životinja fiziološki je sposobno detoksicirati cijanid. Biorazgradnja cijanida može se provoditi u različitim okolišima, kako aerobnim tako i anaerobnim, no u anaerobnim uvjetima stopa biorazgradnje je niža, a mikroorganizmi su osjetljiviji na toksične učinke cijanida [17]. Procesom biorazgradnje, cijanid se pod utjecajem mikroorganizama oksidira u manje toksičan spoj, obično cijanat. Organski dio transformira se u amonijak (NH_4^+) i karbonat (HCO_3^-), dok se slobodni metali, ukoliko su prisutni, adsorbiraju u biofilm [17]. Ukupna biološki posredovana reakcija oksidacije cijanida prikazana je jednadžbom (6).



Po 1 g oksidiranog cijanida troši se oko 0,62 g kisika, a formira se oko 0,54 g amonijaka. Prinos biomase po 1 g oksidiranog cijanida iznosi 0,05 – 0,1 g [102].

Kod bioremedijacije cijanida u otpadnim vodama vrlo je važno osigurati alkalno okruženje ($\text{pH} > 10$) kako bi cijanid ostao u svom ionskom obliku i spriječiti stvaranje isparljivog toksičnog cijanovodika [26]. Hlapivost cijanovodika čak i pri blago alkalnom pH povezana je s njegovom konstantom disocijacije pa su za bioremedijaciju cijanida poželjniji alkalofilni mikroorganizmi. Budući da pH medija opada tijekom rasta bakterija, sugerirana je potrebna kontrola pH vrijednosti kako bi se osigurala potpuna biorazgradnja cijanida i izbjeglo isparavanje cijanovodika. Brzina isparavanja povećava se i porastom temperature, pa je u istraživanju Khamar i sur. [103] najmanja učinkovitost biorazgradnje cijanida zabilježena na $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ što sugerira da su za bioremedijacijski proces poželjniji sojevi koji mogu rasti na nižim temperaturama [103]. Velika većina provedenih istraživanja temelji se na bakteriološkoj biorazgradnji slobodnog cijanida u laboratorijskom mjerilu [28]. López-Ramírez i sur. [69] izolirali su *Rhodococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. i *Tessaracoccus* sp. s različitih lokacija kontaminiranih cijanidom. Rezultati ukazuju na značajnu metaboličku raznolikost mikroorganizama, pri čemu se *Bacillus* sp. istaknuo kao najučinkovitiji među ispitivanim bakterijama [69]. Poznato je da tijekom ekstrakcije zlata i srebra dolazi do reakcije između cijanida i drugih metala prilikom čega nastaju slabi ili jaki kompleksi [28] pa je shodno tome provedeno istraživanje biorazgradnje cijanida bakterijom *Serratia marcescens* u prisutnosti različitih metala (srebro, arsen, kadmij, kobalt, krom, bakar, nikal, olovo, cink i živa). Učinkovitost biorazgradnje cijanida kretala se između 87 i 88 % u prisutnosti navedenih metala, dok je u prisutnosti žive iznosila svega 25 % [104]. Moradkhani i sur. [26] izolirali su iz tla i identificirali bakterijski soj *Pseudomonas parafulva*. Ova bakterija pokazala je visoke stope biorazgradnje, ali uz produljenu lag fazu. Povećanje koncentracije cijanida iznad 200 mg/L imalo je štetan učinak na učinkovitost biorazgradnje, pri čemu je cijanid do te vrijednosti služio kao supstrat, dok su pri višim koncentracijama prevladali njegovi inhibicijski učinci.

Dok su bakterije često primijenjene u biorazgradnji cijanida, samo nekoliko studija izvijestilo je o biorazgradnji cijanida uz pomoć algi. Liu i sur. [70] istražili su učinkovitost biorazgradnje različitih koncentracija cijanida pomoću mikroalge *Chlorella vulgaris*. Rezultati pokazuju da 0,1 mg/L cijanida pogoduje rastu alge i sintezi klorofila, vjerojatno zbog brze razgradnje cijanida u netoksične nusprodukte koji mogu poslužiti kao izvor ugljika. Međutim, mikroalga nije bila sposobna razgraditi cijanid u koncentraciji većoj od 50 mg/L što još jednom potvrđuje da visoke koncentracije cijanida predstavljaju opasnost za integritet stanične membrane mikroorganizma te jednom kada je stanična membrana uništena, cijanidni ion lako ulazi u

stanicu i oštećuje unutarstanični sustav te inhibira daljnu biorazgradnju. Alga je pokazala sposobnost uklanjanja cijanida, no njezin rast može biti inhibiran ako koncentracija cijanida prijeđe toksični prag. Simbioza algi i bakterija predstavlja održiviji pristup u odnosu na samostalnu detoksifikaciju cijanida bakterijama ili algama. Alge fotosintezom proizvode kisik, čime smanjuju potrebu za aeracijom i troškove energije. Istovremeno, bakterije asimiliraju onečišćujuće tvari, pri čemu nastaje ugljikov dioksid koji alge koriste u fotosintezi. Osim toga, dušični nusprodukti služe algama kao hranjive tvari. U istraživanju Abdel Mageed i El Rakaiby [2] bakterijsko-mikroalgalna zajednica detoksificirala je sintetičku otpadnu vodu koja je sadržavala 200 mg/L cijanida, 100 mg/L benzonitrila i 500 mg/L natrijeva salicilata u 3,5 dana. Do otkazivanja sustava došlo je kada je koncentracija cijanida povećana na 250 mg/L [2]. Za biorazgradnju cijanida sposobne su i gljive [17]. *Fusarium oxysporum* sposobna je proizvoditi brojne enzime kada se uzgaja na *Beta vulgaris*, kori naranče, kori mrkve i kori ananasa. Na *Beta vulgaris* postiže učinkovitost biorazgradnje cijanida od 77 % pri 22 °C, dok su simulirani zimski uvjeti (5 °C) nepovoljno utjecali na aktivnost mikroorganizma. Gljive su očito pokazale značajan potencijal biorazgradnje cijanida, međutim njihova primjena ima određena ograničenja, poput spore razgradnje u specifičnim okolišnim uvjetima i osjetljivosti na visoke koncentracije cijanida [105]. **Tablica 6** prikazuje pregled istraživanja biorazgradnje cijanida bakterijama, algama i gljivama pri različitim uvjetima.

2.10.3.1. Metabolički putevi biorazgradnje cijanida

Četiri su metabolička puta biorazgradnje cijanida: hidrolitički, oksidativni, reduktivni i supstitucijski, od kojih prva tri podrazumijevaju pretvorbu cijanida u jednostavne organske ili anorganske molekule, dok supstitucijski put podrazumijeva asimilaciju cijanida u mikroorganizam kao izvor dušika i ugljika [106]. Kojim će se metaboličkim putem cijanid razgraditi, ovisi o enzimu, koncentraciji cijanida te pH vrijednosti medija [28]. **Tablica 7** prikazuje pregled metaboličkih puteva biorazgradnje cijanida.

Tablica 6 Prikaz učinkovitosti biorazgradnje cijanida različitim mikroorganizmima. Parametri uključuju početnu koncentraciju cijanida (γ , mg/L), postotnu učinkovitost razgradnje (X , %), vrijeme potrebno za razgradnju (t , h) i temperaturu provođenja eksperimenta (T , °C)

	mikroorganizam	γ	X	t	pH	T	literatura
		mg/L	%	h	-	°C	
BAKTERIJE	<i>Bacillus</i> sp.	200	21	70	10	30	[69]
	<i>Bacillus</i> sp.	500	41	96	10	34	[107]
	<i>Bacillus licheniformis</i> MMT1	50	100	96	7,5	30	[2]
	<i>Bacillus licheniformis</i> MMT1	1000	100	216	7,5	30	[2]
	<i>Bacillus pumilus</i>	500	100	301	9	30	[108]
	<i>Enterococcus</i> sp.	200	14	70	10	30	[69]
	<i>Halomonas</i> sp.	50	66	120	9,5	25	[103]
	<i>Pseudomonas parafulva</i>	200	93,5	312	9,95	32	[26]
	<i>Rhodococcus</i> sp.	200	11	70	10	30	[69]
	<i>Tessaracoccus</i> sp.	200	12,4	70	10	30	[69]
	neklasificirana	200	86	72	10,3	34,2	[109]
MIKROALGE							
		10	61	72	7	25	[70]
	<i>Chlorella vulgaris</i>	50	5,5	72	7	25	[70]
		100	2,2	72	7	25	[70]
MJEŠOVITA KULTURA BAKTERIJE I MIKROALGE							
	<i>Bacillus licheniformis</i> MMT1 + <i>Chlorella</i> sp.	200	100	84	7,5	30	[2]
		100	77	144	11	22	[105]
		200	58	144	11	22	[105]
		300	62	144	11	22	[105]
GLJIVE	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	61	144	11	5	[105]
		200	48	144	11	5	[105]
		300	48	144	11	5	[105]
	<i>Trametes versicolor</i>	240	85	42	10,5	30	[110]
	<i>Trametes versicolor</i>	400	30	42	10,5	30	[110]

Tablica 7 Metabolički putevi biorazgradnje cijanida

HIDROLITIČKI PUT predstavlja jedan od glavnih bioloških mehanizama detoksikacije cijanida i temelji se na reakcijama hidrolize nitrilne skupine, pri čemu nastaju netoksični produkti poput formamida, karboksilnih kiselina i amonijaka. Ovaj put najčešće se javlja kod gljiva i bakterija [28].
Enzim: cijanid hidrataza Pripada obitelji liaza, specifično hidrolazama, koje kidaju kovalentne veze između ugljika i dušika. Najčešća razgradnja cijanida odvija se posredovanjem ovog enzima, što rezultira stvaranjem formamida, koji se naknadno razlaže na ugljikov dioksid i amonijak. Posjeduje ga većina gljivičnih vrsta [28]. Jednadžba razgradnje cijanida (7): $HCN + H_2O \rightarrow HCONH_2 \quad (7)$
Enzim: cijanid dihidrataza/cijanidaza Direktno pretvara cijanid u relativno netoksični formijat i amonijak [28]. Jednadžba razgradnje cijanida (8): $RCN + 2H_2O \rightarrow RCOOH + NH_3 \quad (8)$
Enzim: nitril hidrataza Učinkovito razgrađuje alifatske i aromatske nitrile do njihovih amida i kiselina [28]. Jednadžba razgradnje cijanida (9): $RCN + H_2O \rightarrow RCONH_2 \quad (9)$
Enzim: nitrilaza Omogućava razgradnju nitrila do karboksilnih kiselina kao krajnjih produkata, bez stvaranja slobodnih amidnih međuprodukata [28, 106]. Jednadžba razgradnje cijanida (10): $RCN + 2H_2O \rightarrow RCOOH + NH_3 \quad (10)$

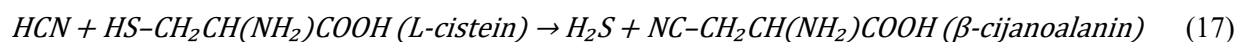
OKSIDATIVNI PUT zahtijeva nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i dodatni izvor ugljika. Imobilizirane stanice <i>Pseudomonas putida</i> oksidativnim putem učinkovito proizvode amonijak i ugljikov dioksid, a razgradnja cijanida ovim putem primijećena je i u tri gljive bijelog truljenja, <i>Trametes versicolor</i>, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> i <i>Pleurotus sajor-caju</i> [28, 106].
Enzim: cijanid dioksigenaza Direktno pretvara cijanid u amonijak i ugljikov dioksid [28]. Jednadžba razgradnje cijanida (11): $HCN + O_2 + 2H^+ + NADPH \rightarrow NADP^+ + CO_2 + NH_3 \quad (11)$
Enzim: cijanid monooksigenaza Pretvara cijanid u cijanat [28]. Jednadžba razgradnje cijanida (12): $HCN + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow CNO^- + NADP^+ + H_2O \quad (12)$
Enzim: cijanid oksigenaza/cijanaza Nastavlja se na cijanid monooksigenazu i pretvara cijanat u amonijak i ugljikov dioksid [28]. Jednadžba razgradnje cijanida (13): $CNO^- + 3H^+ + HCO_3^- \rightarrow NH_4^+ + 2CO_2 \quad (13)$
REDUKTIVNI PUT nije česta pojava jer se smatra da se odvija u anaerobnim uvjetima [28].
Enzim: nitrogenaza Osjetljiva je na kisik i pronađena u rijetkim vrstama. Krajnji produkti razgradnje cijanida su metan i amonijak [28]. HCN može biti podvrgnut redukciji do metanimina (CH_2NH), koji se zatim može hidrolizirati do formaldehida (CH_2O) i amonijaka, ili dodatno reducirati do metilamina (CH_3NH_2). Konačnim redukcijskim korakom nastaju metan (CH_4) i amonijak (NH_3). Jednadžba razgradnje cijanida (14-16): $HCN + 2H^+ + 2e^- \rightarrow CH_2NH \quad (14)$ $CH_2NH + 2H^+ + 2e^- \rightarrow CH_3NH_2 \quad (15)$ $CH_3NH_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow CH_4 + NH_3 \quad (16)$

SUPSTITUCIJSKI PUT uključuje asimilaciju cijanida, što obično dovodi do povećanja rasta mikroorganizma, odnosno prirasta biomase [28].

Enzim: β -cijanoalanin sintaza

Mitohondrijalni enzim prisutan u višim biljkama i insektima katalizira konverziju cisteina u β -cijanoalanin i sumporovodik [28]. Igra važnu ulogu u uklanjanju endogenog cijanida i proizvodi se tijekom vrlo aktivnog razdoblja rasta mikroorganizma.

Jednadžba razgradnje cijanida (17):



Enzimi: sulfurtransferaza i rodanaza

Enzimi pronađeni u mitohondrijalnoj frakciji jetre i bubrega kod životinja. Krajnji produkti su tiocijanat i sulfit [28]. Tiocijanat se može dalje razgraditi karbonilnim ili oksidativnim putem. Rodanaze su uobičajeni enzimi koji se trenutno smatraju jednim od enzima evoluiranih u svrhu detoksifikacije cijanida. Kataliziraju nepovratni prijenos atoma sumpora s prikladnog donatora (npr. tiosulfata) na cijanid, što dovodi do stvaranja manje toksičnog tiocijanata. Aktivnost enzima regulirana je ionima fosfata i dvovalentnim anionima. Sulfurtransferaza pripada obitelji transferaza koje prenose skupine koje sadrže sumpor. Sudjeluje u metabolizmu cisteina [106].

Jednadžba razgradnje cijanida (18):



2.10.4. Biorazgradnja tiocijanata

U usporedbi s cijanidom, tiocijanat pokazuje veću stabilnost i manju sklonost biorazgradnji te hidrolizi što otežava njegovo uklanjanje iz otpadnih voda. Osim toga, poznato je da nepotpuna oksidacija tiocijanata može rezultirati stvaranjem cijanida. S obzirom na to da tiocijanat sadrži sumpor, ugljik i dušik, elemente nužne za rast živih organizama, može poslužiti kao izvor ugljika, dušika i sumpora za mikroorganizme u aerobnim uvjetima [31]. Također je zabilježeno i korištenje dušika iz amonijaka oslobođenog tijekom razgradnje tiocijanata [4]. Amonijak je naknadno potrebno oksidirati u nitrit i nitrat autotrofnom nitrifikacijom, a zatim reducirati u dušik ili dušikov oksid denitrifikacijom. Mikroalge, iako ne razgrađuju tiocijanat, mogu poslužiti za uklanjanje produkata poput amonijaka i nitrata [72].

Biorazgradnja tiocijanata osjetljiv je i spor proces, osobito u usporedbi s biorazgradnjom cijanida i fenola. U sustavima za biološku obradu otpadnih voda, upravo ona određuje hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) [111]. Reakcija biološke oksidacije tiocijanata može se prikazati jednadžbom (19) [112].



Bilo da se radi o kemijskoj ili biološkoj oksidaciji tiocijanata, ona zahtijeva velike količine oksidansa. Stehiometrijski, oksidacija 1 g tiocijanata zahtijeva 1,1 g kisika, pri čemu nastaje oko 0,24 g amonijaka od čega mikroorganizmi mogu iskoristiti otprilike 10 % za sintezu biomase, dok ostatak ostaje u vodi u obliku NH_4^{+} [31]. Amonijak se oslobađa u svim poznatim putevima biorazgradnje tiocijanata te djeluje inhibicijski na biorazgradnju. Nasuprot tome, sulfat nema značajan utjecaj na biorazgradnju tiocijanata, što znači da nema inhibicije kao rezultata njegova nastajanja tijekom procesa degradacije tiocijanata, dok su fenol i cijanid dokazano inhibitori razgradnje [113]. Fenol, cijanid i amonijak smatraju se sekundarnim toksinima te, ovisno o koncentraciji, mogu produljiti vrijeme oksidacije tiocijanata ili potpuno inhibirati proces [34]. U radu Kwon i sur. [114] utvrđeno je da biorazgradnju tiocijanata inhibira fenol u koncentracijama iznad 625 mg/L, cijanid iznad 16 mg/L te nitrit iznad 100 mg/L.

Prinos biomase tijekom biorazgradnje tiocijanata iznosi otprilike 0,08 g po 1 g oksidiranog tiocijanata [115]. Biorazgradnja se može odvijati pomoću pojedinačnih mikroorganizama ili mješovitih mikrobni konzorcija, pri čemu mješovite kulture pokazuju bolje rezultate zbog sposobnosti simultane razgradnje tiocijanata i produkata njegove biorazgradnje [33]. Što su početne koncentracije tiocijanata više, to je učinkovitost biorazgradnje slabija, vjerojatno zbog bržeg nastajanja cijanata koji onda inhibira enzim cijanazu [113].

U istraživanju Raper i sur. [113] mješovita kultura kojom je dominirao *Thiobacillus* (26 %) potpuno je razgradila 110 mg/L tiocijanata unutar 120 h. *Thiobacillus* se pokazao dominantnim i u radu Xiao i sur. [111] s gotovo 80 % zastupljenosti u mikrobnom konzorciju te u radu Li i sur. [31] s preko 20 % zastupljenosti u aktivnom mulju. *Pseudomonas* i *Bacillus* bili su dominantni u aktivnom mulju uređaja za pročišćavanje otpadne vode koksne industrije te su u potpunosti razgradili 1400 mg/L tiocijanata tijekom šest dana [34].

Uvjeti okoliša značajno utječu na učinkovitost biorazgradnje. Pan i sur. [116] pokazali su da povećanje pH sa 6 na 8 značajno poboljšava biorazgradnju tiocijanata (od 5,6 % na 66,4 %), dok daljnje povećanje pH na 9 smanjuje učinkovitost biorazgradnje. Održavanje mezofilne temperature i koncentracije otopljenog kisika (3 – 6 mg/L) također je ključno [31].

Nema dostupnih dokaza o biorazgradnji tiocijanata gljivama [4]. **Tablica 8** prikazuje pregled istraživanja biorazgradnje tiocijanata.

Tablica 8 Prikaz učinkovitosti biorazgradnje tiocijanata bakterijama. Parametri uključuju početnu koncentraciju tiocijanata (γ , mg/L), postotnu učinkovitost razgradnje (X , %), vrijeme potrebno za razgradnju (t , h) i temperaturu provođenja eksperimenta (T , °C)

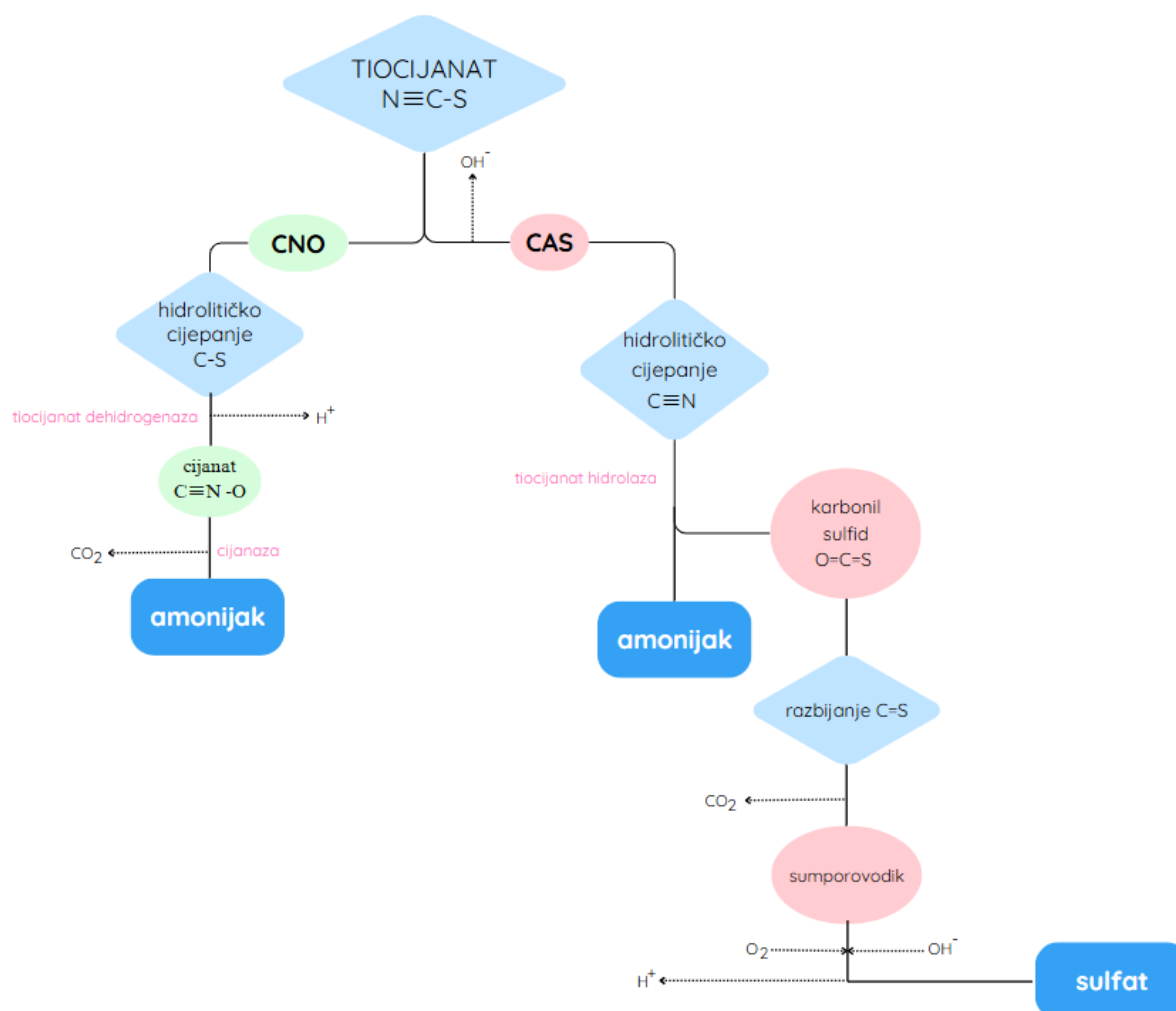
	mikroorganizam	γ	X	t	pH	T	literatura
		mg/L	%	h	-	°C	
BAKTERIJE	<i>Acremonium strictum</i>	7400	100	85	6	25	[114]
	aktivni mulj (<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>)	1400	100	144	7,2	25	[34]
	aktivni mulj (26 % <i>Thiobacillus</i>)	110	100	120	7	25	[113]
	aktivni mulj (26 % <i>Thiobacillus</i>)	360	19	120	7	25	[113]
	aktivni mulj (26 % <i>Thiobacillus</i>)	610	13	120	7	25	[113]
	aktivni mulj (20 % <i>Thiobacillus</i>)	1818	99,96	46	6-7	25	[31]
	<i>Burkholderia</i> sp.	500	100	70	7,7	32	[117]
	<i>Chryseobacterium</i> sp.	500	100	120	7,7	32	[117]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Ralstonia</i> sp.	2500	100	120	6	37	[118]
	<i>Ralstonia</i> sp.	500	100	80	7,7	32	[117]

2.10.4.1. Karbonilni put razgradnje tiocijanata

Karbonilni put razgradnje tiocijanata (CAS) odvija se pod utjecajem tiocijanat hidrolaze u dva koraka. Prvi korak je hidrolitičko cijepanje $C\equiv N$ veze što generira amonijak i karbonil sulfid. Drugi korak je razbijanje veze između ugljika i sumpora unutar $O=C=S$ u ugljikov dioksid i sumporovodik, koji se dalje oksidira u sulfat [4].

2.10.4.2. Cijanatni put razgradnje tiocijanata

U cijanatnom putu razgradnje tiocijanata (CNO), veza između ugljika i sumpora unutar $N\equiv C-S$ hidrolizira se u cijanat pomoću tiocijanat dehidrogenaze, koji se zatim hidrolizira u amonijak i ugljikov dioksid pomoću cijanaze. Sulfidni ion se dalje oksidira u sulfid i sulfat [4]. **Slika 11** shematski prikazuje metaboličke puteve razgradnje tiocijanata.



Slika 11 Mehanizmi razgradnje tiocijanata

2.10.4.3. Anaerobna razgradnja tiocijanata

Primijećena je i anaerobna razgradnja tiocijanata, a relativno niska stopa razgradnje može se objasniti nižim prinosom metaboličke energije povezane s korištenjem elektron akceptora koji su slabiji od kisika. Budući da je jedini akceptor elektrona koji dokazano podržava bakterijsku oksidaciju tiocijanata u odsutnosti kisika nitrat, razgradnja u takvim uvjetima je ograničena nitratom. Anaerobna razgradnja uglavnom nije detektirana u industrijskim sustavima [33].

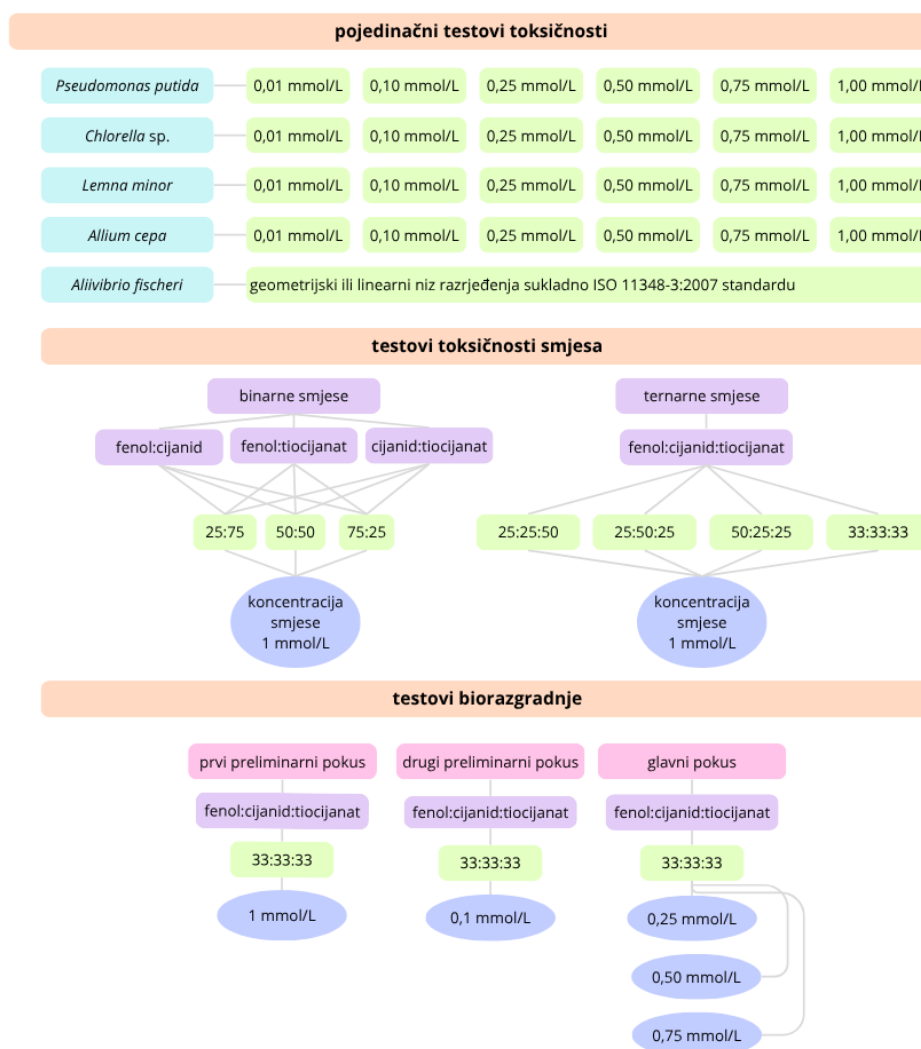
3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog istraživanja osmišljen je s ciljem procjene ekotoksičnosti i potencijala biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata kao relevantnih industrijskih onečišćujućih tvari. U prvoj fazi istraživanja ispitana je toksičnost pojedinačnih otopina fenola, cijanida i tiocijanata na pet testnih organizama: bakterijama *Aliivibrio fischeri* i *Pseudomonas putida*, mikroalgi *Chlorella* sp., vodenoj leći *Lemna minor* te sjemenkama luka *Allium cepa*. Procjena ekotoksičnosti binarnih i ternarnih smjesa fenola, cijanida i tiocijanata provedena je na organizmu *Aliivibrio fischeri*, s ciljem analize mogućih interakcijskih učinaka između komponenata smjese. Na temelju dobivenih rezultata razvijeni su matematički modeli za procjenu toksičnosti smjese. U drugoj fazi istraživanja ispitana je sposobnost biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata bakterijom *Pseudomonas putida*, mikroalgom *Chlorella* sp. i mješovitom kulturom bakterije i mikroalge. Nakon provedenih preliminarnih pokusa biorazgradnje, ispitani su učinci pH vrijednosti, optičke gustoće i početne koncentracije smjese na učinkovitost biorazgradnje u glavnom pokusu biorazgradnje primjenom mikroalge *Chlorella* sp. Glavni pokus biorazgradnje proveden je prema *full factorial* dizajnu, a softverski alat *Design Expert* primijenjen je za optimizaciju procesa.

3.1. Fenol, cijanid i tiocijanat

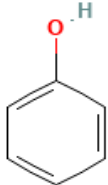
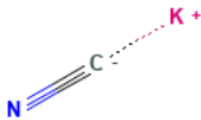
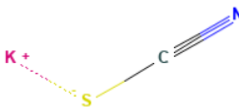
Temeljna otopina fenola pripremljena je otapanjem 1 g fenola (99,5 %, p.a., Sigma-Aldrich, SAD) u 1 L destilirane vode te su iz nje pripremana sva daljnja razrjeđenja. Temeljna otopina cijanida pripremljena je otapanjem 2,5027 g kalijeva cijanida (KCN) ($\geq 98,0$ %, p.a., Sigma-Aldrich, SAD) u 1 L destilirane vode te su iz nje pripremana sva daljnja razrjeđenja. Temeljna otopina tiocijanata pripremljena je otapanjem 1,6732 g kalijeva tiocijanata (KSCN) (99,0 %, p.a., VWR Chemicals, Belgija) u 1 L destilirane vode te su iz nje pripremljena sva daljnja razrjeđenja. Ispitivane koncentracije fenola, cijanida i tiocijanata u testovima toksičnosti sa *Pseudomonas putida*, *Chlorella* sp., *Lemna minor* i *Allium cepa* iznosile su 0,01 mmol/L, 0,10 mmol/L, 0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L, 0,75 mmol/L i 1,00 mmol/L. Za testove toksičnosti s *Aliivibrio fischeri*, serije razrjeđenja pripremane su sukladno metodi. Binarne i ternarne smjese fenola, cijanida i tiocijanata pripremljene su miješanjem temeljnih otopina u različitim omjerima. U svrhu ispitivanja zajedničkog toksičnog djelovanja, pripremljene su smjese tako da ukupna koncentracija toksičnih tvari u svakoj iznosi 1,00 mmol/L. Binarne smjese

pripremljene su u molarnim omjerima 25:75, 50:50 i 75:25, dok su ternarne smjese pripremljene u omjerima 25:25:50, 25:50:25, 50:25:25 i 33,3:33,3:33,3. Za potrebe pokusa biorazgradnje, smjese fenola, cijanida i tiocijanata pripremljene su tri različite koncentracije smjese. U prvom preliminarnom pokusu koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata iznosila je 1 mmol/L, dok je u drugom preliminarnom pokusu koncentracija smjese smanjena na 0,1 mmol/L. U glavnom pokusu biorazgradnje koncentracije smjese iznosile su 0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L i 0,75 mmol/L. Radi preglednog prikaza eksperimentalnog dizajna ispitivanja toksičnosti i biorazgradnje, **Slika 12** prikazuje sve ispitivane kombinacije pojedinačnih tvari, binarnih i ternarnih smjesa fenola, cijanida i tiocijanata, uz pripadajuće koncentracije i omjere komponenti. **Tablica 9** prikazuje fizikalno-kemijska svojstva fenola, cijanida i tiocijanata.



Slika 12 Shema eksperimentalnog dizajna s prikazom ispitivanih koncentracija i omjera fenola, cijanida i tiocijanata u testovima toksičnosti i biorazgradnje

Tablica 9 Fizikalno-kemijska svojstva fenola, cijanida i tiocijanata

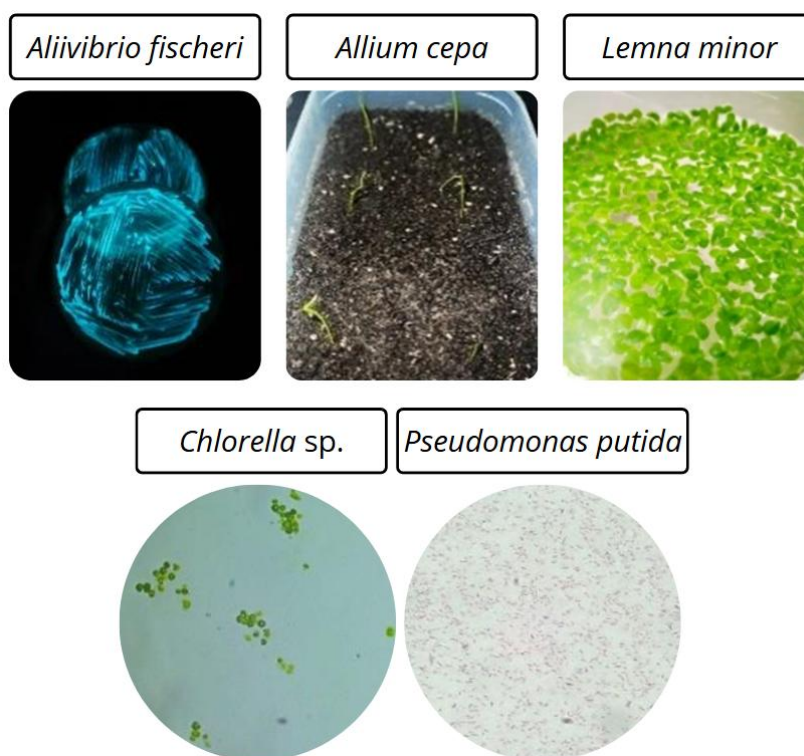
svojstvo	fenol	cijanid	tiocijanat
molekulska formula	C ₆ H ₅ OH	KCN	KSCN
strukturna formula			
piktogrami opasnosti			
molarna masa	94,11 g/mol	65,116 g/mol	97,18 g/mol
pKa (25 °C)	9,99	9,20	5,40
temperatura vrelišta	182 °C	1625 °C	500 °C
temperatura tališta	40,9 °C	634 °C	173 °C
topivost u vodi (25 °C)	82,8 mg/mL	716 mg/mL	1770 mg/mL
topivost u etanolu (25 °C)	400 mg/mL	50 mg/mL	280 mg/mL
tlak pare	0,35 mm Hg	0,35 mm Hg	<0,75 mm Hg
gustoća	1,07 g/cm ³	1,52 g/cm ³	1,9 g/cm ³
izgled (25 °C)	kristalna krutina	kristalna krutina	kristalna krutina
boja	bijela	bijela	bijela
stabilnost u vodi	relativna	velika	relativna
svjetlost	osjetljiv	izrazito stabilan	stabilan
sorpcija na čestice tla	niska	niska	niska do umjerena
biorazgradivost	umjerena	umjerena	umjerena
literatura	[119]	[120]	[121]

3.2. Primijenjeni testovi toksičnosti

Provedeno je pet različitih testova toksičnosti kako bi se procijenila ekotoksičnost fenola, cijanida i tiocijanata:

- 1) test inhibicije luminiscencije s morskom bakterijom *Aliivibrio fischeri*,
- 2) test inhibicije rasta s bakterijom *Pseudomonas putida*,
- 3) test inhibicije rasta s mikroalgom *Chlorella* sp.,
- 4) test inhibicije rasta s vodenom lećom *Lemna minor* i
- 5) test klijavosti s *Allium cepa*.

Za procjenu ekotoksičnosti smjesa fenola, cijanida i tiocijanata primijenjen je test inhibicije luminiscencije s morskom bakterijom *Aliivibrio fischeri*. **Slika 13** prikazuje testne organizme.



Slika 13 Fotografije testnih organizama

3.2.1. Test inhibicije luminiscencije s morskom bakterijom *Aliivibrio fischeri*

Eksperimentalni postupak za procjenu toksičnosti primjenom testa inhibicije luminiscencije s morskom bakterijom *Aliivibrio fischeri* proveden je u skladu s odgovarajućim ISO 11348-3:2007 standardom [38]. Ovaj test temelji se na mjerenju inhibicije luminiscencije bakterije nakon izlaganja ispitivanoj tvari, što omogućuje kvantitativnu procjenu njezine toksičnosti.

Uzgoj kulture

Za kultivaciju bakterije pripremljena je čvrsta hranjiva podloga otapanjem sastojaka (**Tablica 10**) u deioniziranoj vodi. Nakon što podloga nabubri, zagrijava se do vrenja radi potpune homogenizacije te sterilizira autoklaviranjem tijekom 15 minuta (121 °C, 1 atm). Sterilna smjesa raspodijeljena je u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se skrutne. Bakterijska kultura uzgajana je na ohlađenim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

Tablica 10 Sastav čvrste hranjive podloge za uzgoj bakterije *Aliivibrio fischeri*

komponenta	masa [g/L]
NaCl	30,0
glicerol	10,0
CaCO ₃	5,0
pepton	5,0
ekstrakt kvasca	3,0
agar	15,0

Priprema bakterijske suspenzije

Za pripremu bakterijske suspenzije, eza je provučena kroz površinu svježe bakterijske kulture uzgojene na čvrstoj hranjivoj podlozi u duljini od približno 1 cm nakon čega je prenesena u epruvetu do 2/3 napunjenu otopinom za resuspenziju. Otopina za resuspenziju pripremljena je otapanjem komponenti (**Tablica 11**) u deioniziranoj vodi. Nakon prokuhavanja i hlađenja, pH otopine za resuspenziju podešen je na 6,8 do 7,2 dodatkom 1 M otopina natrijeve lužine (NaOH) ili klorovodične kiseline (HCl).

Tablica 11 Sastav otopine za resuspenziju kulture *Aliivibrio fischeri*

komponenta	masa [g/L]
NaCl	20,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
glukoza	10,0 g
rafinoza	10,0 g

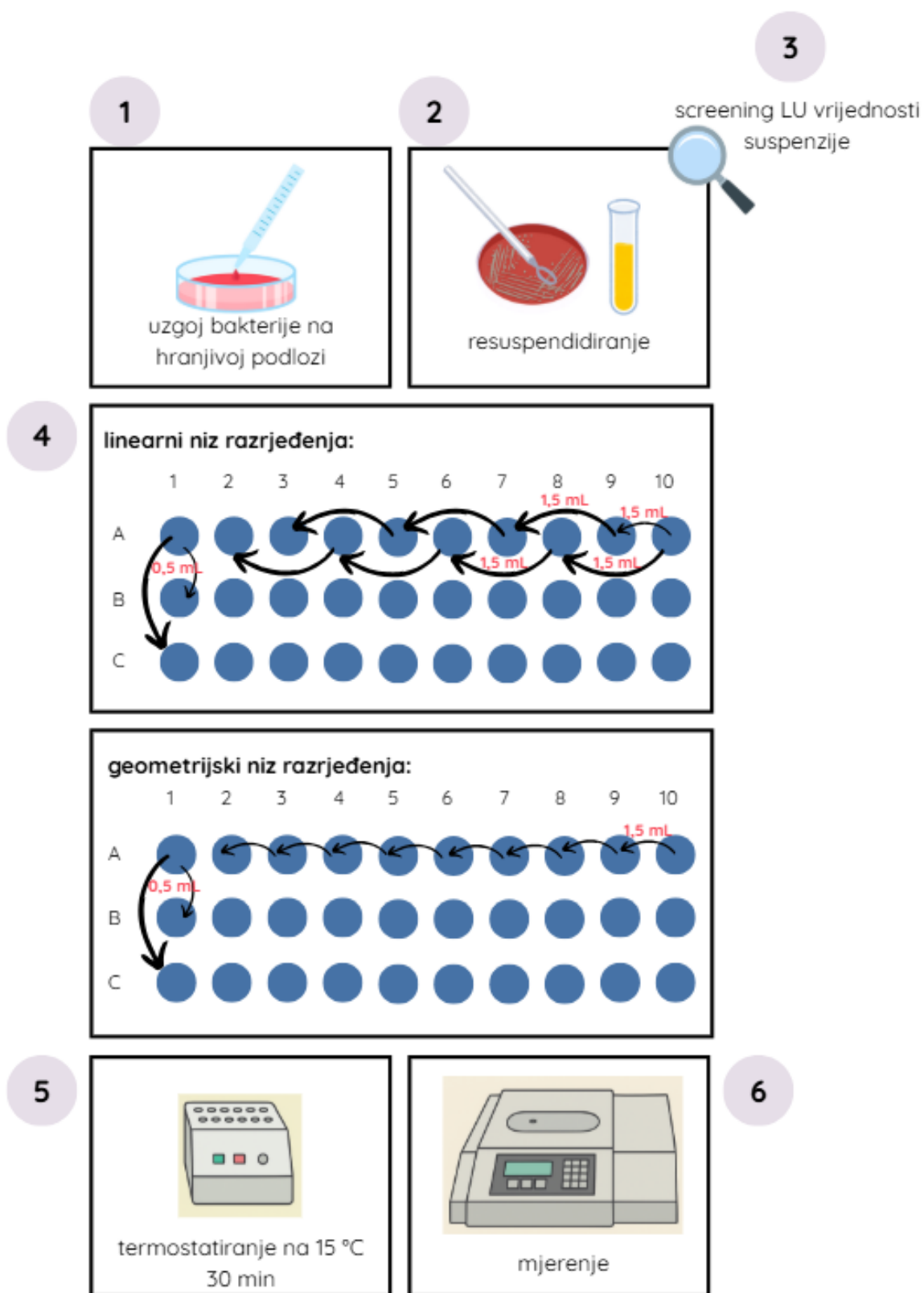
Provedba testa toksičnosti

Test toksičnosti proveden je u staklenim kivetama raspoređenim u tri paralelna niza (A, B, C) koje su sadržavale bakterijsku suspenziju i odgovarajući volumen otopine ispitivane tvari. Toksičnost je ispitivana u serijama razrjeđenja oblikovanih prema linearnom ili geometrijskom nizu. **Slika 14** prikazuje protokol testa toksičnosti s *Aliivibrio fischeri*.

Prije početka mjerenja bilo je potrebno provjeriti početnu luminiscenciju bakterijske suspenzije (tzv. *screening*). Ako izmjerena vrijednost iznosi manje od 1000 relativnih svjetlosnih jedinica (RLU), suspenzija se smatra nedovoljno aktivnom i potrebno ju je koncentrirati. Nakon toga, bakterijska suspenzija aktivirana je u luminotermostatu (LUMIS[®]therm, Hach Lange, SAD) tijekom 30 minuta na temperaturi od 15 °C.

Linearni niz razrjeđenja koristi se kada želimo ispitati učinak više koncentracija koje se povećavaju za isti iznos, primjerice 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L itd. U kivetu A1 (**Slika 14**) dodano je 2/3 ukupnog volumena 2 % NaCl, a u kivetu A10 jednak volumen uzorka. U preostale kivete niza A (A2 – A9) dodano je po 1,5 mL 2 % NaCl. Niz razrjeđenja pripremljen je na sljedeći način: iz kivete A10 prenosi se 1,5 mL u A9, sadržaj se homogenizira, zatim se 1,5 mL prenosi u A7, homogenizira, potom u A5, i konačno u A3. Paralelno, 1,5 mL iz A10 prenosi se u A8, zatim u A6, pa u A4 i na kraju u A2, pri čemu se sadržaj svake kivete također homogenizira. Na kraju, u sve kivete nizova B i C dodaje se po 0,5 mL bakterijskog inokuluma.

Geometrijski niz razrjeđenja koristi se kada se koncentracije smanjuju geometrijski, odnosno višestrukim razrjeđenjem. U kivetu A1 (**Slika 14**) dodano je 2/3 ukupnog volumena 2 % NaCl, a u A10 jednak volumen uzorka. U sve preostale kivete (A2 – A9) dodano je po 1,5 mL 2 % NaCl. Zatim se 1,5 mL iz A10 prenosi u A9, sadržaj se homogenizira, a postupak se ponavlja redom sve do A1. U svaku kivetu nizova B i C dodaje se po 0,5 mL bakterijskog inokuluma.



Slika 14 Protokol testa toksičnosti s *Aliivibrio fischeri*

Kvantifikacija toksičnog učinka

Luminiscencija testne suspenzije mjerena je na početku testa i nakon 30 minuta izloženosti. Mjerenja su provedena luminometrom (LUMISTox 300, Hach Lange, SAD) pri valnoj duljini od 480 nm. Inhibicija luminiscencije izračunata je prema jednadžbi (20):

$$INH = \frac{LUM_0 - LUM_{30}}{LUM_0} \times 100 \% \quad (20)$$

gdje je

- LUM_0 luminiscencija izmjerena na početku testa, a
- LUM_{30} luminiscencija izmjerena nakon 30 minuta izloženosti bakterije ispitivanoj tvari.

Krajnji rezultat testa izražen je kao EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, koje luminometar automatski generira po završetku mjerenja.

3.2.2. Test inhibicije rasta s bakterijom *Pseudomonas putida*

Test inhibicije rasta s bakterijom *Pseudomonas putida* proveden je u skladu s ISO 10712:1995 standardom [43] uz dvije modifikacije. Prvo, bakterijska kultura je prije početka eksperimenata rekultivirana u mineralnom mediju prema uputama, ali je glukoza isključena iz mineralnog medija jer njezina prisutnost može potencijalno maskirati štetne učinke primijenjenih toksičnih tvari. Drugo, vrijeme izlaganja produženo je na 72 h, budući da nije primijećen inhibicijski učinak pri standardnom vremenu izlaganja od 16 h.

Uzgoj kulture

Kao podloga za uzgoj bakterije *Pseudomonas putida* korišten je hranjivi agar, pripremljen vaganjem komercijalnog hranjivog bujona prema specifikaciji proizvođača, uz dodatak 1,8 % agara (Agar Technical). Sastojci su otopljeni u deioniziranoj vodi te ostavljeni 15 min da bubrenjem formiraju homogenu smjesu, nakon čega je suspenzija zagrijavana do vrenja. Podloga je sterilizirana u autoklavu tijekom 15 minuta (121 °C, 1 atm). Sterilna smjesa raspodijeljena je u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se skrutne. Bakterijska kultura uzgajana je na ohlađenim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama tijekom 24 h pri temperaturi od 37 °C.

Priprema bakterijske suspenzije

Rekultivacija je provedena tako da je manja količina svježe bakterijske kulture uzgojene na čvrstoj hranjivoj podlozi prenesena u mineralni medij tijekom $5 \pm 0,5$ h na rotacijskoj tresilici pri 150 o/min i sobnoj temperaturi. Mineralni medij pripremljen je u odmjernoj tikvici otapanjem sastojaka (**Tablica 12**) u deioniziranoj vodi. pH vrijednost mineralnog medija podešena je na 6,9 pomoću 1 M otopina NaOH i HCl. Prije upotrebe, mineralni medij je podvrgnut sterilizaciji u autoklavu (121 °C, 1 atm). Optička gustoća bakterijske suspenzije mjerena je pomoću spektrofotometra (DR/2400, Hach Lange, SAD) pri valnoj duljini od 436 nm.

Tablica 12 Sastav mineralnog medija

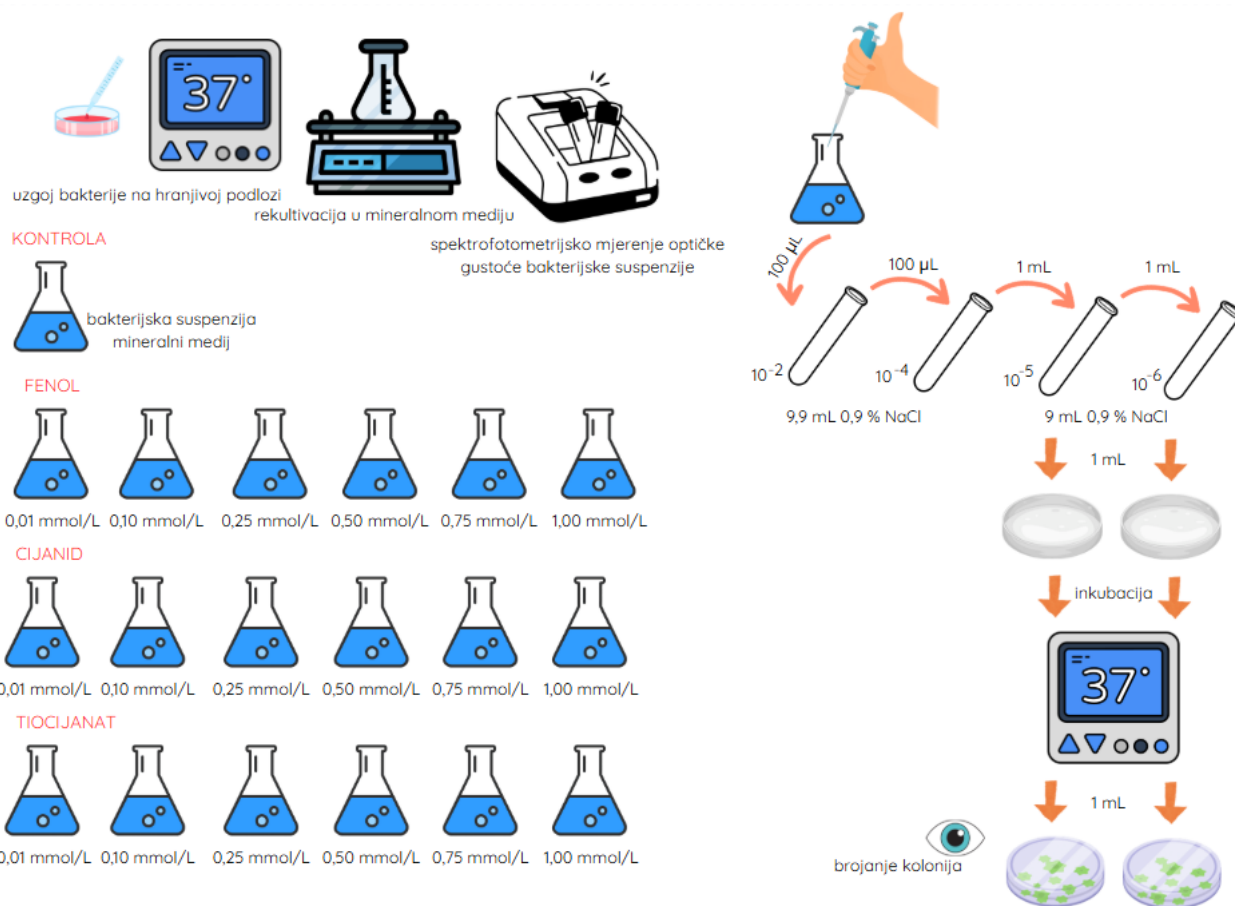
komponenta	masa [mg/L]
KH ₂ PO ₄	0,50
K ₂ HPO ₄	0,50
CaCl ₂	0,10
NaCl	0,20
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,50
MnSO ₄ × 7H ₂ O	0,01
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,01
NH ₄ NO ₃	1,00

Provedba testa toksičnosti

Eksperimenti su provedeni u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama koje su sadržavale bakterijsku suspenziju, mineralni medij i ispitivanu tvar. Osim toga, pripremljeni su i kontrolni uzorci s istim sastojcima, ali bez toksične tvari. **Tablica 13** prikazuje početne eksperimentalne uvjete testa toksičnosti sa *Pseudomonas putida*, a **Slika 15** prikazuje protokol testa toksičnosti sa *Pseudomonas putida*.

Tablica 13 Eksperimentalni uvjeti testa toksičnosti sa *Pseudomonas putida*

parametar	mjerna jedinica	vrijednost
optička gustoća	-	0,20
CFU	st/mL	$1,9 \times 10^8$
pH	-	7,6
γ (O ₂)	mg/L	7,7
<i>t</i>	h	72
smjernica	-	ISO 10712



Slika 15 Protokol testa toksičnosti sa *Pseudomonas putida*

Kvantifikacija toksičnog učinka

Tijekom pokusa, nakon 24, 48 i 72 h izlaganja određivan je broj živih bakterijskih stanica u svim uzorcima. Broj živih stanica izražen je kao CFU (engl. *colony forming units*), što predstavlja broj stanica u uzorku koje su sposobne formirati vidljive kolonije na hranjivoj podlozi. Praćenjem dinamike rasta u kontrolnim i tretiranim uzorcima moguće je procijeniti stupanj inhibicije rasta bakterija pod utjecajem ispitivane tvari. Za potrebe brojanja CFU, iz svakog uzorka pripremljena su serijska decimalna razrjeđenja korištenjem sterilne fiziološke otopine (0,9 % NaCl), čija je funkcija bila očuvanje osmotske stabilnosti stanica tijekom razrjeđivanja. Fiziološka otopina sterilizirana je autoklaviranjem prije upotrebe.

Nakon 24 h inkubacije, pripremljena su razrjeđenja 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} . Prvo razrjeđenje (10^{-2}) dobiveno je dodavanjem 100 μ L homogenizirane bakterijske suspenzije u 9,9 mL fiziološke otopine. Iz tog razrjeđenja, 100 μ L preneseno je u novu epruvetu s 9,9 mL fiziološke otopine kako bi se dobilo razrjeđenje 10^{-4} . Sljedeća razrjeđenja (10^{-5} i 10^{-6}) pripremljena su

dodatkom 1 mL prethodnog razrjeđenja u 9 mL fiziološke otopine. Od razrjeđenja 10^{-5} i 10^{-6} , po 1 mL suspenzije preneseno je u sterilne Petrijeve zdjelice, nakon čega je dodana tekuća hranjiva podloga. Sadržaj je promiješan kružnim pokretima kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela stanica. Nakon očvršćivanja hranjive podloge, zdjelice su inkubirane 24 h na 37 °C. Broj kolonija zabilježen je nakon inkubacije, a cijeli je postupak ponovljen nakon 48 i 72 h trajanja pokusa. Dobivene vrijednosti služile su za izračun CFU prema jednadžbi (21), a rezultati su dalje upotrijebljeni za kvantifikaciju inhibicije rasta.

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad (21)$$

Iz poznatih CFU vrijednosti, stupanj inhibicije bakterijskog rasta računa se prema jednadžbi (22), a izračunati postotak inhibicije služio je za daljnju procjenu toksičnog učinka.

$$INH = \frac{CFU_{\text{slijepa proba}} - CFU_{\text{uzorak}}}{CFU_{\text{slijepa proba}}} \times 100 \% \quad (22)$$

gdje je

- $CFU_{\text{slijepa proba}}$ broj kolonija bakterija u kontrolnom uzorku, koji nije bio izložen ispitivanoj tvari, a
- CFU_{uzorak} broj kolonija bakterija u uzorcima s različitim koncentracijama ispitivane toksične tvari.

Za dodatnu interpretaciju rezultata, izračunate su i vrijednosti EC_{50} i EC_{20} . Obje vrijednosti određene su interpolacijom lineariziranih eksperimentalnih podataka, dobivenih na temelju izračunatih postotaka inhibicije za različite koncentracije toksičnih tvari.

U svrhu linearnog prikaza podatka i određivanja EC vrijednosti, izračunat je gama faktor (γ) prema jednadžbi (23):

$$\gamma = \frac{INH}{100 - INH} \quad (23)$$

Logaritamska vrijednost faktora γ ($\ln \gamma$) linearno raste s logaritmom molarne koncentracije ispitivane tvari ($\ln c$), što omogućuje primjenu linearne regresije. Linearni prikaz doza-odgovor temelji se na funkcionalnoj ovisnosti prema jednadžbi (24):

$$\ln(\gamma) = a \times \ln(c) + b \quad (24)$$

gdje je

- a nagib pravca, a
- b presjek s ordinatom, odnosno vrijednost $\ln \gamma$ kada je $\ln c = 0$.

Ovaj pristup omogućuje određivanje EC_{20} i EC_{50} vrijednosti interpolacijom unutar dobivene regresijske jednadžbe. Budući da $\ln \gamma$ iznosi nula kada je $INH = 50\%$ (tj. $\gamma = 1$), vrijednost $\ln c$ za koju $\ln \gamma = 0$ odgovara EC_{50} koncentraciji. Slično, vrijednost $\ln \gamma = \ln(0,25)$ korištena je za procjenu EC_{20} .

3.2.3. Test inhibicije rasta s mikroalgom *Chlorella* sp.

Test inhibicije rasta s mikroalgom *Chlorella* sp. proveden je u skladu s OECD 201:2011 smjernicama [52]. Ovaj test temelji se na mjerenju inhibicije rasta mikroalgi uslijed izloženosti toksičnoj tvari tijekom definiranog vremenskog razdoblja.

Uzgoj kulture

Mikroalga *Chlorella* sp. uzgajana je tijekom 10 dana u bazalnom mediju (**Tablica 14**), čiji je sastav osiguravao odgovarajuće uvjete za rast zelenih jednostaničnih algi. Medij je pripremljen pipetiranjem 10 mL koncentrirane otopine u 500 mL odmjernu tikvicu, nakon čega je podešen pH (8,151) i steriliziran autoklaviranjem (121 °C, 20 min). Uzgoj se provodio u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama uz kontinuiranu aeraciju sterilnim zrakom, pri izmjeni svjetlosnih uvjeta 16 h svjetlosti i 8 h tame, u temperaturno kontroliranom prostoru. Zrak je u sustav upuhivan preko sterilnog filtera (ReliaDisc™, Ahlstrom-Munksjö, Finska) s porama promjera 0,45 µm. Rast kulture pratio se spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće suspenzije na 670 nm (DR/2400, Hach Lange, SAD). Prije početka eksperimenta, uzgojena kultura po potrebi je razrjeđivana sterilnim bazalnim medijem kako bi se postigla optimalna početna koncentracija stanica.

Tablica 14 Sastav bazalnog medija

komponenta	masa [mg/L]
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	1 × 10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	7 × 10 ⁻³
NaHCO ₃	50

Provedba testa toksičnosti

Test toksičnosti proveden je u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama u trajanju od 72 h. Svaka tikvica sadržavala je pripremljenu mikroalgnu suspenziju i odgovarajuću koncentraciju ispitivane tvari, dok su kontrolni uzorci sadržavali isti volumen suspenzije bez dodatka toksične tvari. Tikvice su tijekom pokusa kontinuirano miješane na rotacijskoj tresilici kako bi se spriječila sedimentacija stanica te osigurala homogenost uzoraka. **Tablica 15** prikazuje početne eksperimentalne uvjete testa toksičnosti s *Chlorella* sp., a **Slika 16** prikazuje protokol testa toksičnosti s *Chlorella* sp.

Tablica 15 Eksperimentalni uvjeti testa toksičnosti s *Chlorella* sp.

parametar	mjerna jedinica	vrijednost
optička gustoća	-	0,02
CFU	st/mL	3,6 × 10 ⁵
pH	-	8,2
γ (O ₂)	mg/L	7,9
t	h	72
smjernica	-	OECD 2011

uzgoj mikroalge u bazalnom mediju



24 °C
16/8 h
10 d

spektrofotometrijsko mjerenje
optičke gustoće suspenzije



KONTROLA



suspenzija mikroalge
bazalni medij

FENOL



0,01 mmol/L 0,10 mmol/L 0,25 mmol/L 0,50 mmol/L 0,75 mmol/L 1,00 mmol/L

CIJANID

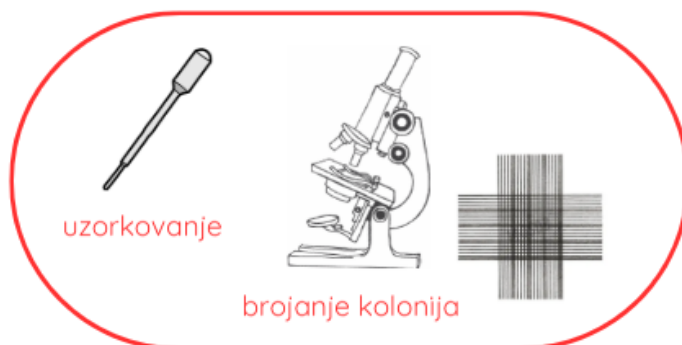


0,01 mmol/L 0,10 mmol/L 0,25 mmol/L 0,50 mmol/L 0,75 mmol/L 1,00 mmol/L

TIOCIJANAT



0,01 mmol/L 0,10 mmol/L 0,25 mmol/L 0,50 mmol/L 0,75 mmol/L 1,00 mmol/L



uzorkovanje

brojanje kolonija

Slika 16 Protokol testa toksičnosti s *Chlorella* sp.

Kvantifikacija toksičnog učinka

Učinci izloženosti toksičnoj tvari praćeni su kroz promjene u ukupnom broju kolonija mikroalgi, koji je izražen kao CFU vrijednost. Postupak brojanja proveden je tako da su se sterilnom Pasteurovom pipetom iz uzoraka uzimale dvije kapi dobro homogenizirane suspenzije koje su se nanosile na predmetnicu i prekrivale pokrovnicom. Broj kolonija određivan je pomoću optičkog mikroskopa (Olympus Bx50, Olympus Optical, Japan) s Thoma komorom pri ukupnom povećanju od 400 x. Ukupan broj živih stanica (N) izražen je prema jednadžbi (25):

$$N = \frac{m \times n \times 16 \times 10^4}{K} \quad (25)$$

gdje je

- m ukupan broj prebrojanih kolonija,
- n faktor razrjeđenja,
- 16 ukupan broj velikih kvadrata na predmetnici, a
- K broj kvadrata unutar kojih je izvršeno brojanje.

Mjerenja su provedena 24 h, 48 h i 72 h nakon početka pokusa. Na temelju promjene broja stanica tijekom vremena izračunat je postotak inhibicije rasta prema jednadžbi (24). Na temelju dobivenih vrijednosti postotka inhibicije, izračunate su EC_{20} i EC_{50} vrijednosti kao što je opisano u poglavlju 3.2.2..

3.2.4. Test inhibicije rasta s vodenom lećom *Lemna minor*

Test inhibicije rasta proveden je prema OECD 221:2006 smjernicama [56] i temelji se na praćenju stope rasta, duljine korijena, sinteze klorofila i morfoloških promjena *Lemna minor* tijekom izlaganja ispitivanim tvarima.

Uzgoj kulture

Prije početka testa, mlade zdrave biljke *Lemna minor* s dva do tri listića uzgajane su najmanje sedam dana u Steinbergovu mediju (**Tablica 16**) uz režim osvjetljenja od 16 h svjetlosti i 8 h tame.

Tablica 16 Sastav Steinbergova medija

komponenta	masa [mg/L]
makroelementi	
KNO ₃	350,00
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	295,00
KH ₂ PO ₄	90,00
K ₂ HPO ₄	12,60
MgSO ₄ × 7H ₂ O	100,00
mikroelementi	
H ₃ BO ₃	120,00
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	180,00
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	44,00
MnCl ₂ × 4H ₂ O	180,00
FeCl ₃ × 6H ₂ O	760,00
EDTA	1500,00

Provedba testa toksičnosti

Eksperimenti su provedeni u staklenim čašama koje su sadržavale Steinbergov medij, ispitivanu tvar i deset listića *Lemna minor* s prethodno uklonjenim korijenjem. Paralelno su postavljene kontrolne čaše s jednakim volumenom Steinbergova medija, ali bez dodatka ispitivane tvari. Test je trajao sedam dana pri uvjetima prikazanim u **Tablica 17**. **Slika 17** prikazuje protokol testa toksičnosti s *Lemna minor*.

Tablica 17 Eksperimentalni uvjeti testa toksičnosti s *Lemna minor*

parametar	mjerna jedinica	vrijednost
<i>T</i>	-	24 ± 2
svjetlost/tama	h/h	16/8
<i>t</i>	d	7
smjernica	-	OECD 2006



Slika 17 Protokol testa toksičnosti s *Lemna minor*

Kvantifikacija toksičnog učinka

Po završetku vremena izlaganja utvrđen je broj listića, a specifična stopa rasta izračunata je prema jednadžbi (26):

$$\mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{t} \quad (26)$$

gdje je

- μ specifična stopa rasta *Lemna minor* [d^{-1}],
- $\ln(N_t)$ prirodni logaritam broja listića na kraju pokusa,
- $\ln(N_0)$ prirodni logaritam broja listića na početku pokusa, a
- t vrijeme izlaganja izraženo u danima.

Dobivene vrijednosti specifične stope rasta upotrijebljene su za izračun inhibicije rasta, prema jednadžbi (27):

$$INH = \frac{\mu_{slijepa\ proba} - \mu_{uzorak}}{\mu_{slijepa\ proba}} \times 100 \% \quad (27)$$

gdje je

- $\mu_{slijepa\ proba}$ specifična stopa rasta u kontrolnom uzorku [d^{-1}], a
- μ_{uzorak} specifična stopa rasta u uzorku s ispitivanom tvari [d^{-1}].

Na temelju tako dobivenih vrijednosti inhibicije, određene su EC vrijednosti kao što je ranije opisano u poglavlju 3.2.2.

Osim broja listića, kao dodatni biometrijski parametar analizirana je prosječna duljina korijena, određena mjerenjem deset nasumično odabranih listića iz svake čaše pomoću milimetarskog papira, prema metodi Kalčíkové i sur. [122]. Uz to, kao pokazatelj funkcionalnog stanja fotosintetskog aparata, određen je sadržaj klorofila a i b. Klorofili viših biljaka, paprati, mahovina i zelenih algi, uključuju klorofil a kao glavni pigment i klorofil b kao pomoćni pigment. Ovi klorofili sastavni su dijelovi fotosintetskih membrana i pojavljuju se u omjeru (a/b) koji se obično kreće između 3 i 12, pri čemu uvjeti rasta i okolišni faktori mogu modificirati taj omjer. Na primjer, biljke izložene jakom svjetlu imaju omjer klorofila a i b između 3,2 i 4, dok biljke koje rastu u sjeni pokazuju niže vrijednosti, od 2,5 do 2,9. Ovaj omjer odražava adaptaciju biljaka na svjetlosne uvjete i može se koristiti kao pokazatelj stanja fotosintetskog aparata. Sadržaj klorofila u uzorcima biljnog materijala određen je spektrofotometrijski prema metodi Lichtenthalera [123]. Svježi biljni materijal homogeniziran

je u mraku u prisutnosti etanola, nakon čega je pohranjen u zamrzivaču do analize. Analiza je podrazumijevala mjerenje apsorbancije supernatanta na valnim duljinama 664,2 nm (*klorofil a*) i 648,6 nm (*klorofil b*) spektrofotometrom (DR/2400, Hach Lange, SAD) Koncentracije klorofila a i klorofila b izražene u mg/L izračunate su prema jednadžbama (28) i (29):

$$Chl\ a = 13,36 \times A_{664,2} - 5,19 \times A_{648,6} \quad (28)$$

$$Chl\ b = 27,43 \times A_{648,6} - 8,12 \times A_{664,2} \quad (29)$$

gdje je

- *Chl a* sadržaj klorofila a,
- *Chl b* sadržaj klorofila b,
- $A_{664,2}$ vrijednost apsorbancije izmjerene pri 664,2 nm te
- $A_{648,6}$ vrijednost apsorbancije izmjerene pri 648,6 nm.

Ukupan sadržaj klorofila izražava se kao zbroj klorofila a i b. Inhibicija sadržaja klorofila izražena je kao postotak smanjenja u odnosu na početnu vrijednost te je izračunata prema jednadžbi (30):

$$INH = \frac{Chl_{slijepa\ proba} - Chl_{uzorak}}{Chl_{slijepa\ proba}} \times 100\ \% \quad (30)$$

gdje je

- $Chl_{slijepa\ proba}$ sadržaj klorofila u kontrolnom uzorku, a
- Chl_{uzorak} sadržaj klorofila u uzorku s toksičnom tvari.

3.2.5. Test klijavosti s *Allium cepa*

Procjena fitotoksičnosti na *Allium cepa* provodila se pomoću testa klijavosti, sukladno OECD 208:2006 smjernicama [56].

Karakteristike kulture

U testu klijavosti upotrijebljene su sjemenke običnog luka *Allium cepa*, pripadnika porodice *Amaryllidaceae*. Primijenjena je komercijalna sorta Stuttgarter Riesen, proizvedena od strane talijanske tvrtke L'ortolano, a distribuirana putem dobavljača Planta Prelesje d.o.o. Serija

korištenih sjemenki označena je brojem QB0634, a njihova klijavost prethodno je ispitana tijekom 2021. i 2022. godine.

Analiza tla

Radi utvrđivanja udjela vlage, suhe tvari i hlapivih komponenti, provedena je gravimetrijska analiza na dva uzorka tla. Uzorci su najprije izvagani pa sušeni na 105 °C kako bi se uklonio višak vode nakon čega su ponovno vagani radi izračuna udjela vlage i suhe tvari prema jednadžbama (31) i (32):

$$w(H_2O) = \frac{m(\text{supstrata})_{VT} - m(\text{supstrata})_{ST}}{m(\text{supstrata})_{VT}} \times 100 \% \quad (31)$$

$$w(\text{suhe tvari}) = 100 \% - w(H_2O) \quad (32)$$

gdje je

- $m(\text{supstrata})_{VT}$ masa tla prije sušenja, a
- $m(\text{supstrata})_{ST}$ masa tla nakon sušenja na 105 °C.

Osušeni uzorci dodatno se termički obrađuju spaljivanjem u digestoru i žarenjem u peći na 550 °C kako bi se odredio udio hlapive tvari. Nakon završetka žarenja, izvršeno je završno vaganje, a dobivene mase služile su za izračune udjela hlapive tvari, prema jednadžbi (33):

$$w(\text{hlapive tvari}) = \frac{m(\text{supstrata})_{ST} - m(\text{pepeo})}{m(\text{supstrata})_{ST}} \times 100 \% \quad (33)$$

gdje je

- $m(\text{supstrata})_{ST}$ masa tla nakon sušenja na 105 °C, a
- $m(\text{pepeo})$ masa tla dobivena nakon žarenja u peći pri 550 °C.

Za određivanje pH vrijednosti, električne vodljivosti i koncentracije otopljenog kisika, pripremljen je eluat suspediranjem 10 g tla u 100 mL destilirane vode. Svojstva poput udjela organske tvari, ukupnog dušika i omjera C/N analizirana su od strane proizvođača tla (Zagrebački Holding d.o.o., Podružnica Zrinjevac) u suradnji sa Zavodom za ishranu bilja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. **Tablica 18** prikazuje rezultate analize tla.

Tablica 18 Fizikalno-kemijske karakteristike tla upotrijebljenog u testu fitotoksičnosti

parametar	mjerna jedinica	vrijednost
pH	-	8,19
γ (O ₂)	mg/L	8,18
κ	$\mu\text{S}/\text{cm}$	169
T	°C	20
w (vlage)	%	61,67
w (suhe tvari)	%	38,33
w (hlapive tvari)	%	41,67
w (organske tvari)	%	58,33
w (N)	%	1,3-2,5
C/N omjer	-	20/1

Provedba testa fitotoksičnosti

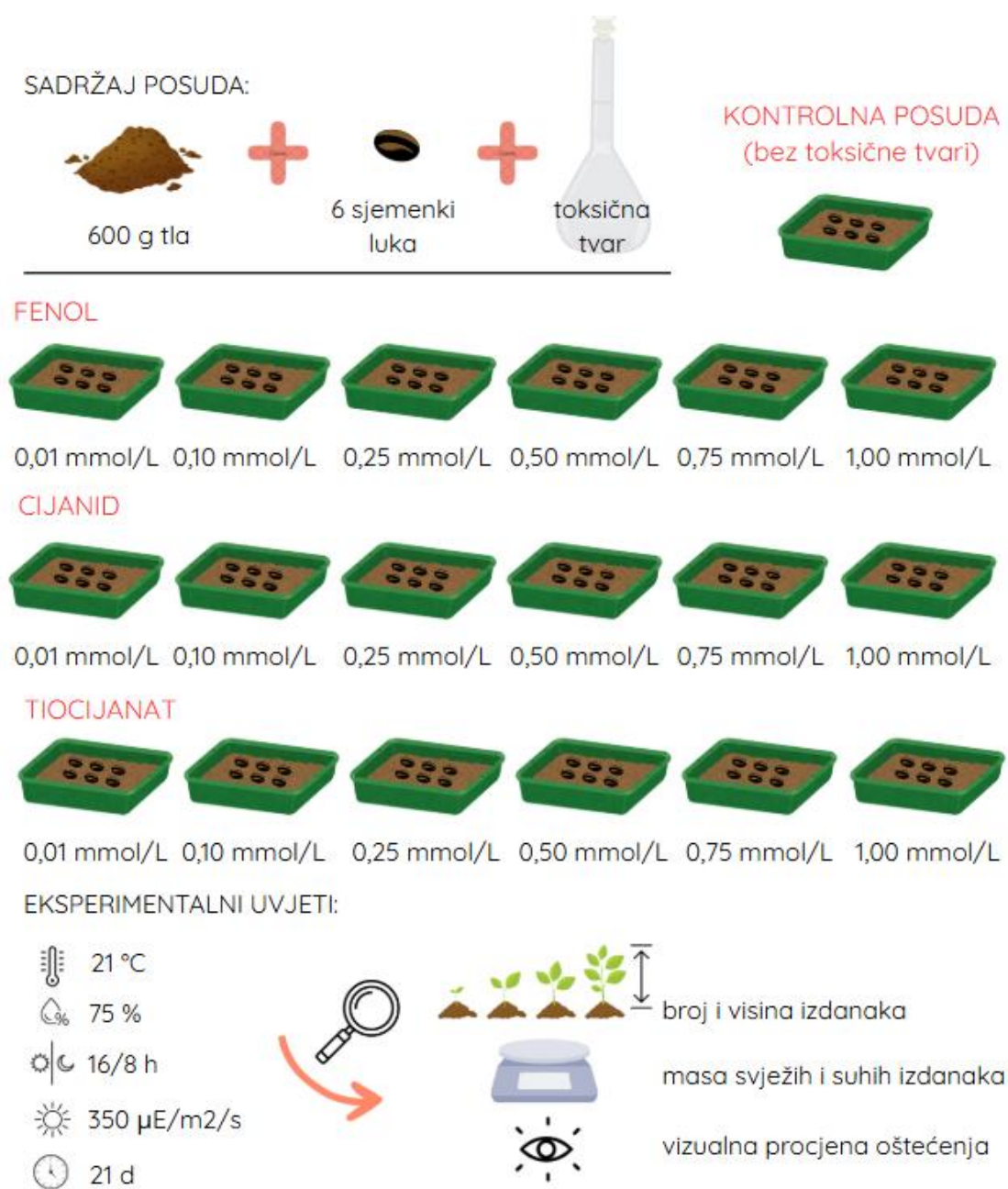
Prva faza eksperimentalnog postupka obuhvaćala je pripremu šest plastičnih posuda, od kojih je pet ispunjeno tlom tretiranim različitim koncentracijama ispitivane tvari, dok je šesta služila kao negativna kontrola za usporedbu rezultata.

Slika 18 prikazuje protokol testa fitotoksičnosti s *Allium cepa*.

U svaku posudu odvagano je po 600 g tla, nakon čega je dodano 20 mL otopine odgovarajuće koncentracije toksične tvari. Kontrolna posuda sadržavala je jednaku količinu destilirane vode. Volumen dodane tekućine odabran je kako bi se izbjeglo zasićenje tla i osigurala optimalna apsorpcija. Nakon dodavanja otopina, sadržaj svake posude temeljito je homogeniziran ručnim miješanjem kako bi se postigla ravnomjerna raspodjela tvari unutar tla. Nakon što je tlo u posudama temeljito homogenizirano, u svakoj su napravljena udubljenja za postavljanje sjemenki *Allium cepa*. U svaku je udubljenje položena po jedna sjemena, pri čemu je u svaku posudu ukupno dodano šest sjemenki. One su raspoređene simetrično, tri sjemenke sa svake strane, kako bi se osigurala ravnomjerna prostorna raspodjela unutar posude. Nakon postavljanja, sjemenke su prekrivene slojem tla, a posude su zatim smještene u termost, gdje je temperatura održavana na 20 ± 1 °C tijekom čitavog trajanja pokusa. Odabrana temperatura odgovara optimalnim uvjetima za klijanje i početni rast luka, a nadzirana je pomoću preciznog termometra. Osvjetljenje je osigurano automatiziranim svjetlosnim sustavom, s režimom od 16 h svjetla i 8 h tame, čime su simulirani uvjeti prirodnog dana pogodnog za rast biljaka. Sjemenke luka *Allium cepa* izlagale su se ispitivanim tvarima 21 dan. **Tablica 19** prikazuje eksperimentalne uvjete testa fitotoksičnosti s *Allium cepa*.

Tablica 19 Eksperimentalni uvjeti testa fitotoksičnosti s *Allium cepa*

parametar	mjerna jedinica	vrijednost
T	°C	$21 \pm 0,5$
RH	%	70 ± 25
izmjena svjetla	h	16/8
intenzitet svjetla	$\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	350 ± 50
t	d	21
smjernica	-	OECD 2006



Slika 18 Protokol testa fitotoksičnosti s *Allium cepa*

Kvantifikacija toksičnog učinka

Tijekom cijelog pokusa pratio se broj i visina izdanaka. Završna mjerenja obuhvaćala su vizualnu procjenu nicanja, visinu izdanaka, postotak klijavosti, prisutnost vidljivih štetnih učinaka na različitim dijelovima biljaka te određivanje mase svježih i suhih izdanaka. Dobiveni rezultati usporedili su se s onima iz kontrolne posude kako bi se utvrdio potencijalni fitotoksični učinak ispitivane tvari. Na temelju broja niknulih sjemenki izračunata je inhibicija klijavosti prema jednadžbi (34):

$$INH = \frac{n_{slijepa\ proba} - n_{uzorak}}{n_{slijepa\ proba}} \times 100 \% \quad (34)$$

gdje je

- $n_{slijepa\ proba}$ prosječan broj niknulih sjemenki u kontrolnoj skupini, a
- n_{uzorak} prosječan broj niknulih sjemenki u ispitivanom uzorku.

Na temelju tako dobivenih vrijednosti inhibicije, određene su EC vrijednosti kao što je ranije opisano u poglavlju 3.2.2.

3.3. Test biorazgradnje

Ukupno je provedeno tri pokusa biorazgradnje, dva preliminarna i jedan glavni. Test biorazgradnje je obuhvaćao:

- 1) prvi preliminarni pokus za ispitivanje učinkovitosti biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 1 mmol/L primjenom bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. te njihove mješovite kulture;
- 2) drugi preliminarni pokus za ispitivanje učinkovitosti biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 0,1 mmol/L primjenom bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. te njihove mješovite kulture i
- 3) glavni pokus biorazgradnje koji je proveden prema *full factorial* dizajnu s ciljem određivanja optimalnih uvjeta biorazgradnje smjese.

3.3.1. Priprema mikroorganizama

Priprema *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp. provedena je na jednak način kao u prethodno opisanim testovima toksičnosti, u skladu s postupcima opisanim u poglavljima 3.2.2. i 3.2.3. Bakterija *Aliivibrio fischeri*, primijenjena za procjenu ekotoksičnosti početnih otopina i filtrata nakon pokusa biorazgradnje, pripremljena je prema protokolu navedenom u poglavlju 3.2.1.

U preliminarnim pokusima, kao osnovni medij za uzgoj mikroorganizama te za pripremu otopina onečišćujućih tvari upotrijebljen je mineralni medij (**Tablica 12**). U glavnom pokusu, sastav mineralnog medija izmijenjen je u odnosu na preliminarne pokuse zbog niske učinkovitosti biorazgradnje tiocijanata, koja se može pripisati inhibicijskom učinku viših koncentracija amonijaka i sulfata prisutnih u prvobitnom sastavu mineralnog medija. S ciljem povećanja učinkovitosti biorazgradnje i istodobnog osiguravanja optimalnih uvjeta za rast mikroalgi, odabran je modificirani mineralni medij s reduciranim koncentracijama potencijalno inhibirajućih iona, temeljen na literaturnim preporukama [124]. **Tablica 20** prikazuje sastav modificiranog mineralnog medija.

Tablica 20 Sastav modificiranog mineralnog medija

komponenta	masa [mg/L]
NH ₄ Cl	15,00
MgCl ₂ × 6H ₂ O	12,00
CaCl ₂ × 2H ₂ O	18,00
MgSO ₄ × 7H ₂ O	15,00
KH ₂ PO ₄	1,60
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,08
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O	0,10
H ₃ BO ₃	0,185
MnCl ₂ × 4H ₂ O	0,415
ZnCl ₂	$3,0 \times 10^{-3}$
CoCl ₂ × 6H ₂ O	$1,5 \times 10^{-3}$
CuCl ₂ × 2H ₂ O	1×10^{-5}
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	$7,0 \times 10^{-3}$
NaHCO ₃	50,00

3.3.2. Preliminarni pokusi biorazgradnje

U preliminarnim pokusima biorazgradnje ispitana je učinkovitost biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata primjenom tri različita biološka sustava:

- 1) bakterijske kulture *Pseudomonas putida*,
- 2) mikroalge *Chlorella* sp. te
- 3) njihove mješovite kulture.

Svaki pokus trajao je 14 dana, a eksperimentalni uvjeti odabrani su temeljem dostupne literature [88]. Oba preliminarna pokusa provedena su pod identičnim fizikalno-kemijskim uvjetima (Tablica 21), uz jedinu razliku u početnoj koncentraciji smjese. U prvom preliminarnom pokusu, koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata iznosila je 1,0 mmol/L, dok je u drugom preliminarnom pokusu smanjena na 0,1 mmol/L. Smanjenje koncentracije rezultat je slabe učinkovitosti biorazgradnje zabilježene tijekom prvog preliminarnog pokusa. Početna vrijednost optičke gustoće određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 600 nm za bakterijsku suspenziju, odnosno 670 nm za algalnu suspenziju na spektrofotometru DR/2400 (Hach Lange, SAD). Ciljane početne vrijednosti bile su $\sim 10^6$ stanica/mL za bakteriju te $10^5 - 10^6$ stanica/mL za mikroalgu. Prilikom formiranja mješovite kulture upotrijebljeni su jednaki volumeni bakterijske i algalne suspenzije radi postizanja uravnoteženog početnog odnosa organizama.

Za svaki pokus postavljene su tri reaktorske jedinice:

- R1: smjesa onečišćujućih tvari i suspenzija bakterije *Pseudomonas putida*,
- R2: smjesa onečišćujućih tvari i suspenzija mikroalge *Chlorella* sp. i
- R3: smjesa onečišćujućih tvari i suspenzija mješovite kulture bakterije i mikroalge u omjeru 1:1.

Usporedno su postavljene i kontrolni uzorci (SP1, SP2 i SP3) bez smjese onečišćujućih tvari, kako bi se isključio učinak abiotičkih faktora te pratilo bazalno ponašanje mikroorganizama u mineralnom mediju. Pokusi su provedeni u Erlenmeyerovim tikvicama s radnim volumenom od 100 mL. U sterilnim tikvicama pripremljena je smjesa fenola, cijanida i tiocijanata, nakon čega je dodana kultura. Tikvice su inkubirane pri sobnoj temperaturi na rotacijskoj tresilici pri 150 rpm.

Tablica 21 Početni uvjeti preliminarnih pokusa biorazgradnje. Parametri uključuju pH vrijednost, koncentraciju kisika (γ , mg/L), temperaturu (T , °C), elektrovodljivost (κ , $\mu\text{S/cm}$) i gustoću bakterijske populacije izraženu kao log CFU

uzorak	pH	γ (O ₂)	T	κ	log CFU
	-	[mg/L]	[°C]	[$\mu\text{S/cm}$]	-
prvi preliminarni pokus					
SP1	7,12	7,80	25,00	3,79	6,28
SP2	7,11	7,11	25,00	3,53	5,81
SP3	7,12	7,12	25,00	3,35	6,07
R1	7,12	7,80	25,00	3,79	6,28
R2	7,11	7,11	25,00	3,53	5,81
R3	7,12	7,12	25,00	3,35	6,07
drugi preliminarni pokus					
SP1	7,20	8,03	24,70	2,12	6,92
SP2	7,27	8,34	23,80	2,40	6,68
SP3	7,22	8,22	23,30	2,22	7,62
R1	7,20	8,03	24,70	2,12	6,92
R2	7,27	8,34	23,80	2,40	6,68
R3	7,22	8,22	23,30	2,22	7,62

Uzorkovanje je provedeno svaka 24 h tijekom prva tri dana pokusa, te nakon 7 i 14 dana. U uzorcima su određivane CFU vrijednosti bakterije i mikroalge te koncentracije otopljenog kisika, fenola, cijanida i tiocijanata. Određivanje CFU vrijednost *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp. prethodno je opisano u poglavljima 3.2.2. i 3.2.3. U slučaju mješovitih kultura, kvantifikacija je provedena odvojeno za svaku komponentu. Koncentracija fenola određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) na uređaju Perkin Elmer Flexar, dok su cijanid i tiocijanat kvantificirani ionskom kromatografijom (IC) na uređaju Wayeal IC6600. Uzorci za analizu prethodno su filtrirani kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm. Na početku i na kraju pokusa dodatno su zabilježeni pH i električna vodljivost. Mjerenje pH vrijednosti, koncentracije otopljenog kisika, temperature i električne vodljivosti otopina provedeno je pomoću višekanalnog uređaja WTW Multi 3430. Za određivanje pH vrijednosti upotrijebljena je elektroda WTW SenTix 940, dok je koncentracija otopljenog kisika određena pomoću optičke sonde WTW FDO 925, a mjerenje električne vodljivosti uporabom elektrode WTW TetraCon 325. Morfološke promjene mikroorganizama također su praćene tijekom pokusa. *Chlorella* sp. mikroskopirana je na nativnim preparatima pod povećanjem od 400 x, dok je za bakteriju izrađen trajni preparat i obojan po Gramu, nakon čega je mikroskopiran pod povećanjem od 1000 x. Po završetku pokusa, filtrati su podvrgnuti testu toksičnosti s morskom bakterijom *Aliivibrio fischeri*.

Postotak biorazgradnje pojedine tvari izračunat je prema jednadžbi (35):

$$\text{biorazgradnja} = \frac{c_0 - c_t}{c_0} \times 100 \% \quad (35)$$

gdje je

- c_0 početna koncentracija tvari, a
- c_t koncentracija nakon izlaganja mikroorganizmima tijekom vremena.

3.3.3. Glavni pokus biorazgradnje

Na temelju rezultata preliminarne pokusa, za daljnje ispitivanje odabrana je mikroalga *Chlorella* sp., koja je pokazala najveću sposobnost biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata. Eksperimentalni postupak bio je jednak kao u preliminarne pokusima, osim što je trajanje pokusa u ovom slučaju bilo skraćeno na 7 dana umjesto prvobitnih 14. Kako bi se identificirali optimalni uvjeti za biorazgradnju smjese, glavni pokus biorazgradnje oblikovan je prema *Full Factorial* dizajnu s tri varijable ispitane na tri razine (3^3). Takav pristup omogućuje

sustavno ispitivanje utjecaja pojedinačnih varijabli, kao i njihovih međudjelovanja, na odabrani odzivni parametar. Kao varijable ispitane su:

- početna koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata (0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L i 0,75 mmol/L),
- optička gustoća suspenzije mikroalge (0,1, 0,5 i 1,0) te
- početna pH vrijednost medija (6, 8 i 10).

Tablica 22 prikazuje kombinacije razina pojedinih varijabli.

Tablica 22 Kombinacije triju varijabli na tri razine u glavnom pokusu biorazgradnje

tikvica	c smjese	optička gustoća	pH
	[mmol/L]	[-]	[-]
T1	0,50	0,10	10
T2	0,25	0,10	6
T3	0,25	0,10	8
T4	0,75	0,10	10
T5	0,25	0,10	10
T6	0,50	0,10	6
T7	0,75	0,10	6
T8	0,50	0,10	8
T9	0,75	0,10	8
T10	0,25	0,50	10
T11	0,75	0,50	6
T12	0,25	0,50	8
T13	0,75	0,50	8
T14	0,50	0,50	8
T15	0,75	0,50	10
T16	0,50	0,50	10
T17	0,25	0,50	6
T18	0,50	0,50	6
T19	0,50	1,00	6
T20	0,25	1,00	6
T21	0,25	1,00	8
T22	0,50	1,00	10
T23	0,75	1,00	6
T24	0,75	1,00	10
T25	0,25	1,00	10
T26	0,50	1,00	8
T27	0,75	1,00	8

Kao odziv (engl. *response*) u optimizacijskom modelu postavljen je prosječni stupanj biorazgradnje smjese toksičnih tvari, izražen u postotku, a izračunat prema jednadžbi (36):

$$biorazgradnja = \frac{(c_{0,F} - c_{t,F}) + (c_{0,CN} - c_{t,CN}) + (c_{0,SCN} - c_{t,SCN})}{c_{0,F} + c_{0,CN} + c_{0,SCN}} \times 100 \% \quad (36)$$

gdje je

- c_0 početna koncentracija tvari (fenola F, cijanida CN, tiocijanata SCN), a
- c_t koncentracija tvari (fenola F, cijanida CN, tiocijanata SCN) nakon sedam dana eksperimenta.

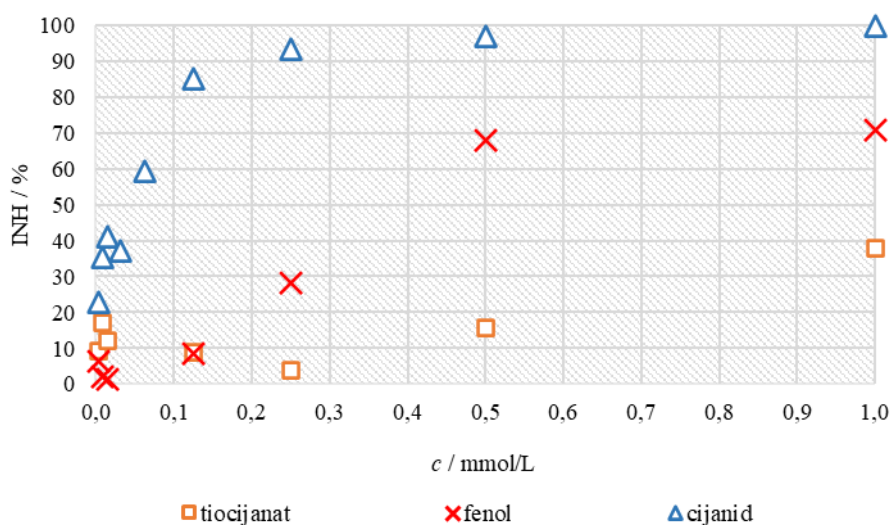
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati testova toksičnosti

Kako bi se procijenio toksični učinak fenola, cijanida i tiocijanata, provedena je serija testova toksičnosti s različitim testnim organizmima.

4.1.1. Rezultati testa toksičnosti s *Aliivibrio fischeri*

Toksičnost fenola, cijanida i tiocijanata za bakteriju *Aliivibrio fischeri* testirana je u nizu koncentracija od 1 mmol/L do razrjeđenja 1:256, a rezultati su izraženi kao inhibicija luminiscencije. Procijenjene su i EC₂₀ te EC₅₀ vrijednosti (Tablica 27). Slika 19 prikazuje ovisnost inhibicije luminiscencije bakterije *Aliivibrio fischeri* o koncentraciji ispitivane toksične tvari.



Slika 19 Ovisnost inhibicije luminiscencije bakterije *Aliivibrio fischeri* o koncentraciji toksične tvari

Fenol je pokazao jasan trend porasta inhibicije luminiscencije s porastom koncentracije. Pri najvišoj koncentraciji od 1 mmol/L, fenol je uzrokovao inhibiciju luminiscencije od 67,67 %, dok je pri najnižoj testiranoj koncentraciji (razrjeđenje 1:256) inhibicija iznosila 7,88 % što upućuje na toksični učinak fenola na *Aliivibrio fischeri* koji je ovisan o dozi.

Cijanid slijedi sličan obrazac, no pokazuje znatno jače inhibitorne učinke u usporedbi s fenolom. Pri koncentraciji od 1 mmol/L, cijanid je potpuno inhibirao luminiscenciju (99,75 %). Čak i pri najnižoj testiranoj koncentraciji (razrjeđenje 1:256), cijanid je uzrokovao znatnu inhibiciju luminiscencije od 32,47 %. Ovi rezultati ukazuju na izrazitu osjetljivost bakterije *Aliivibrio fischeri* na cijanid, što je u skladu s poznatim mehanizmom djelovanja ovog spoja koji uključuje inhibiciju enzima citokrom c oksidaze i blokadu staničnog disanja [40]. S obzirom na to da je riječ o mehanizmu koji neposredno zahvaća vitalne energetske puteve bakterije, fiziološko stanje stanice može imati značajan utjecaj na osjetljivost prema ovom spoju.

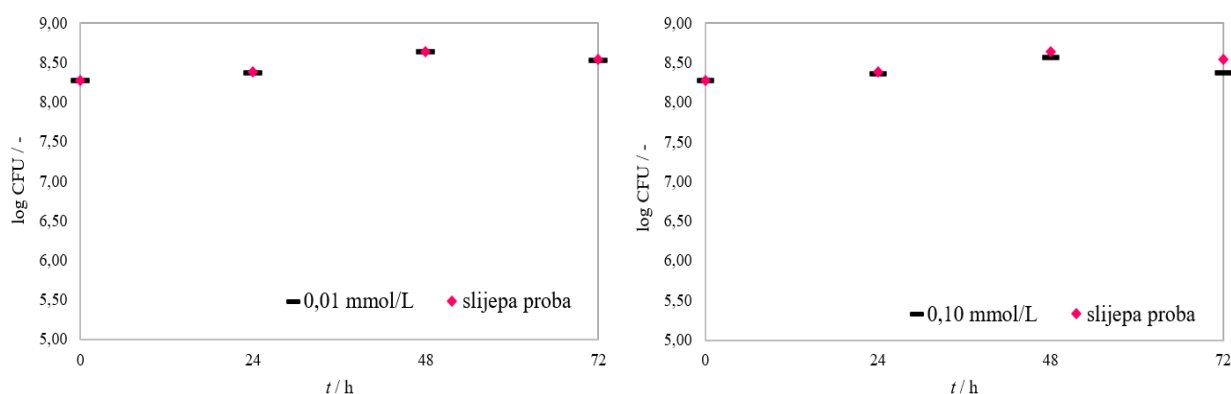
Tiocijanat je bio najmanje toksičan za *Aliivibrio fischeri* od tri ispitivane tvari. Najviša koncentracija tiocijanata od 1 mmol/L rezultirala je inhibicijom luminiscencije od 37,85 %, što je otprilike polovica inhibicije zabilježene za fenol i trećina one za cijanid pri istoj koncentraciji. Pri razrjeđenju 1:4, tiocijanat je uzrokovao minimalnu inhibiciju od 3,96 %.

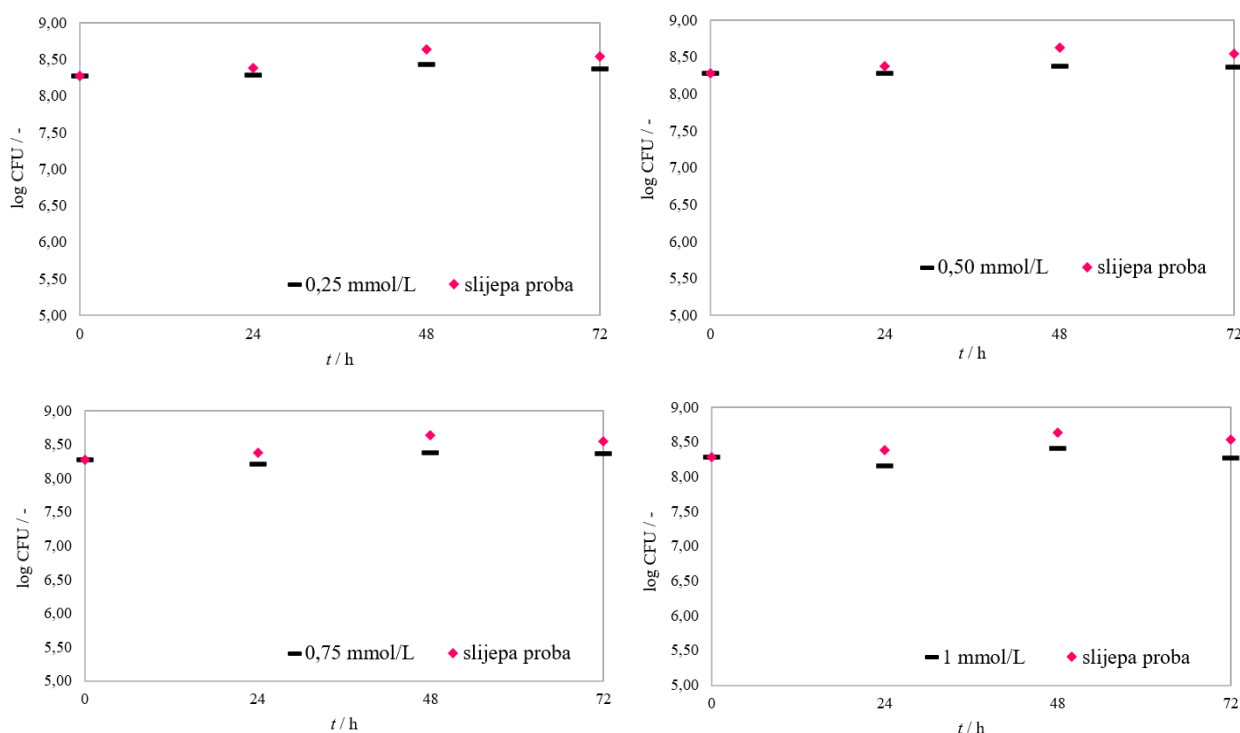
4.1.2. Rezultati testa toksičnosti sa *Pseudomonas putida*

Ispitivanje toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata provedeno je na bakterijskoj kulturi *Pseudomonas putida* u trajanju od 72 h pri različitim koncentracijama toksičnih tvari. Rezultati su izraženi kao inhibicija rasta, a procijenjene su i EC₂₀ te EC₅₀ vrijednosti (**Tablica 27**).

Utjecaj fenola na *Pseudomonas putida*

Slika 20 prikazuje rezultate toksičnosti fenola za bakteriju *Pseudomonas putida* u koncentracijskom rasponu od 0,01 do 1 mmol/L. Podaci su prikazani u obliku grafikona kao ovisnost logaritamske CFU vrijednosti o vremenu.





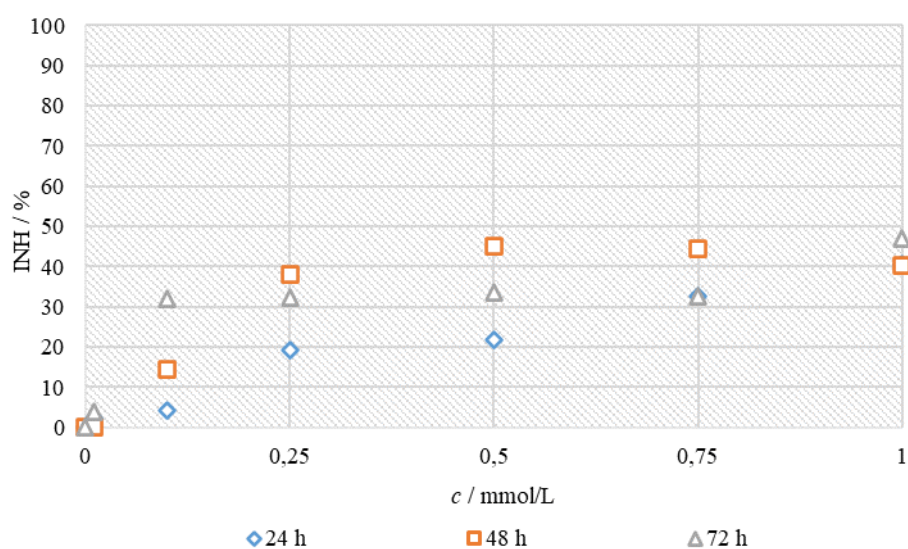
Slika 20 Promjene logaritamske CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas putida* tijekom vremena pri izloženosti različitim koncentracijama fenola

Promatrajući svaku koncentraciju fenola kao izdvojen sustav, može se uočiti isti trend za sve ispitane koncentracije. Tijekom prva 24 h, fenol blago stimulira rast bakterije, što se očituje u većem broju kolonija u uzorcima koji su sadržavali fenol u usporedbi s kontrolom. Nakon 48 h, broj kolonija i dalje raste pri svim ispitivanim koncentracijama fenola, no u ovom slučaju niti jedan uzorak ne premašuje broj kolonija u kontrolnom uzorku. U kontrolnom je uzorku broj kolonija porastao s početnih $1,9 \times 10^8$ CFU/mL na $4,3 \times 10^8$ CFU/mL. Najslučajniji tom porastu bio je uzorak s najnižom koncentracijom fenola (0,01 mmol/L), kod kojeg je broj kolonija porastao s $2,4 \times 10^8$ CFU/mL na $4,3 \times 10^8$ CFU/mL, te uzorak s najvišom koncentracijom fenola (1,00 mmol/L), kod kojeg je broj kolonija porastao s $1,4 \times 10^8$ CFU/mL na $2,6 \times 10^8$ CFU/mL. Nakon 72 h zabilježen je pad broja kolonija i u kontrolnom uzorku i u svim uzorcima s fenolom, bez iznimke.

Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da bakterija *Pseudomonas putida* slijedi klasičnu krivulju mikrobnog rasta, koja uključuje početno umnožavanje stanica, a potom fazu njihovog odumiranja. Stres uzrokovan fenolom očituje se isključivo u manjem broju kolonija u uzorcima izloženima fenolu u odnosu na kontrolu. To ukazuje na prisutnu, ali blagu inhibiciju rasta. Ovo opažanje može se pripisati saznanju da *Pseudomonas putida* posjeduje ključne enzime za razgradnju aromatskih spojeva koji omogućuju učinkovitu biotransformaciju fenola

[125]. Sposobnost vrste ove vrste da koristi fenol kao izvor ugljika i energije poznata je još od 1970-ih godina [126] što potvrđuje dvoznačnost fenola kao istovremeno dostupnog supstrata i stresora za bakterijske stanice. Iako *Pseudomonas putida* posjeduje sposobnost razgradnje fenola, prisutnost fenola u ispitivanim koncentracijama ipak dovodi do umjerenog smanjenja rasta u odnosu na kontrolu.

Slika 21 prikazuje učinak različitih koncentracija fenola na inhibiciju rasta bakterije *Pseudomonas putida*.



Slika 21 Ovisnost inhibicije rasta *Pseudomonas putida* o koncentraciji fenola

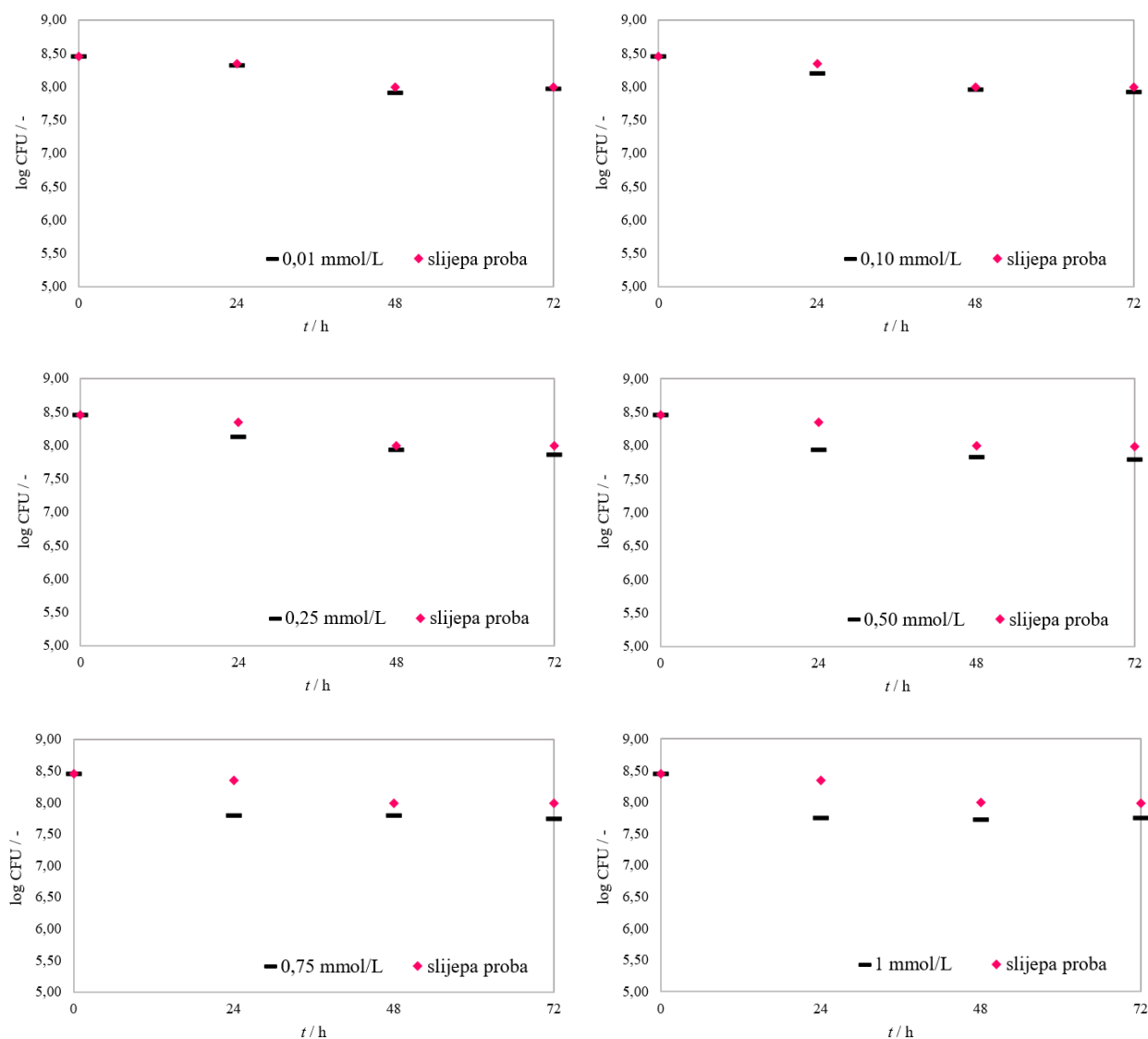
Iz izračunate inhibicije rasta, temeljene na razlici u broju kolonija između uzoraka s fenolom i kontrolnog uzorka, vidljivo je da fenol ima inhibicijski učinak na rast bakterije. Kontrolni uzorak bez fenola dosljedno je pokazivao veći porast broja kolonija u usporedbi s uzorcima s fenolom. S porastom koncentracije fenola, povećavao se i postotak inhibicije rasta bakterije. Primjetna je i izraženija inhibicija rasta nakon 48 h u odnosu na onu zabilježenu nakon 24 h. Nakon 72 h trend porasta inhibicije s vremenom i koncentracijom više nije linearan, ali se ni značajno ne smanjuje. Određene varijacije u broju kolonija moguće je pripisati tehničkim pogreškama pri uzorkovanju, naciepljivanju ili brojanju kolonija. Najveći postotak inhibicije zabilježen je nakon 72 h u uzorku s 1,00 mmol/L fenola (46,97 %), što upućuje na izraženu ovisnost inhibicije rasta o koncentraciji fenola, ali i o vremenu izloženosti.

Prema Kewelohu i sur. [127] minimalna koncentracija fenola koja uzrokuje inhibiciju rasta *Pseudomonas putida* iznosi približno 800 mg/L, što je osam puta više od najviše koncentracije u ovom istraživanju (1 mmol/L $\approx$ 100 mg/L). Ova razlika dodatno potvrđuje visoku otpornost

vrste *Pseudomonas putida* na fenol koja se djelomično može pripisati strukturi vanjske membrane. Lipopolisaharidi, kao sastavni dio vanjske membrane Gram-negativnih bakterija, djeluju kao difuzijska barijera za mnoge toksične spojeve, uključujući fenol. Osim toga, *Pseudomonas putida* tijekom rasta može izlučivati izvanstanične tvari poput polisaharida i proteina koje formiraju difuzni zaštitni sloj oko kolonija [127]. Ovu tezu potvrđuje i istraživanje Santosa i sur. [128] u kojemu je pokazano da *Pseudomonas putida* reagira na kemijski stres fenola putem promjena u strukturi stanične membrane, čime se ograničava prodor toksične tvari, kao i aktivacijom sustava aktivnog izbacivanja (*efflux*), koji smanjuju intracelularnu koncentraciju štetnih molekula. Proteomska analiza provedena na soju *Pseudomonas putida* KT2440 pokazala je da izloženost fenolu izaziva promjene u relativnoj zastupljenosti brojnih proteina uključenih u stanični metabolizam, oksidacijski odgovor, podjelu stanica i pokretljivost, što dodatno potvrđuje složenost adaptacijskog odgovora na fenol. Iako razgradnja fenola nije nužan uvjet za preživljavanje u njegovoj prisutnosti, poznato je da mnogi sojevi *Pseudomonas putida* posjeduju genetski potencijal za biotransformaciju fenola, čime se tijekom dulje izloženosti dodatno smanjuje njegov toksičan učinak [128]. Iako *Pseudomonas putida* raspolaže enzimskim sustavima za biotransformaciju fenola [125], rezultati ovog istraživanja upućuju na to da tijekom 72 h izloženosti ipak prevladava obrambeni odgovor bakterije. Umjereno, ali postojano smanjenje rasta u prisutnosti fenola, unatoč poznatoj sposobnosti njegove razgradnje, sugerira da se bakterija u početnoj fazi prvenstveno štiti od prodora fenola mehanizmima poput modifikacije membrane, izlučivanja zaštitnih tvari i aktivacije sustava za aktivno izbacivanje toksičnih molekula. Ovi obrambeni procesi omogućuju preživljavanje u stresnim uvjetima, ali ne podrazumijevaju nužno učinkovitu mineralizaciju fenola. S druge strane, biotransformacija fenola vjerojatno započinje u kasnijoj fazi, nakon aktivacije specifičnih enzima, čime se toksični učinak dodatno ublažava tijekom dulje izloženosti. Opaženi rezultati potvrđuju da tolerancija bakterije ne ovisi isključivo o sposobnosti razgradnje fenola, već i o složenom, višeslojnom adaptacijskom odgovoru koji uključuje obrambene strategije na razini membrane, proteoma i metabolizma [128].

Utjecaj cijanida na *Pseudomonas putida*

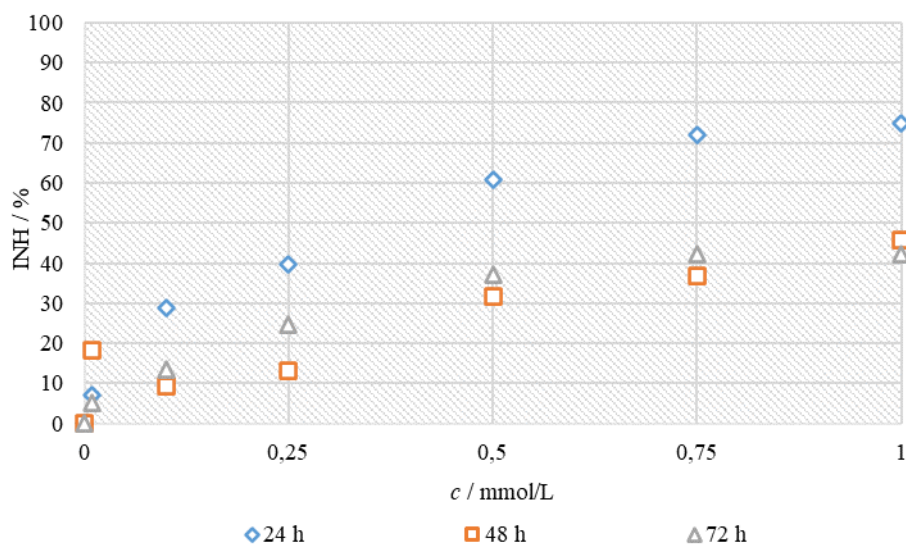
Slika 22 prikazuje rezultate toksičnosti cijanida za bakteriju *Pseudomonas putida* u koncentracijskom rasponu od 0,01 mmol/L do 1 mmol/L. Rezultati su prikazani u obliku grafikona, kao ovisnost logaritamske CFU vrijednosti o vremenu.



Slika 22 Promjene logaritamske CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas putida* tijekom vremena pri izloženosti različitim koncentracijama cijanida

Rezultati testa toksičnosti cijanida na bakteriju *Pseudomonas putida* ukazuju na izražen toksični učinak, koji se očituje smanjenjem broja kolonija s porastom koncentracije cijanida, ali i s produljenjem vremena izloženosti. Što je koncentracija cijanida bila viša, a vrijeme izlaganja dulje, to je broj kolonija bio manji. Tijekom prva 24 h zabilježen je gotovo linearan pad broja kolonija s povećanjem koncentracije cijanida. Nakon 48 h i 72 h pad je i dalje prisutan, ali manje izražen u usporedbi s početnim razdobljem. Kod dviju najviših koncentracija cijanida (0,75 mmol/L i 1,00 mmol/L) broj kolonija ostaje sličan ($5,3 \times 10^7$ CFU/mL i $6,2 \times 10^7$ CFU/mL) kroz sve vremenske točke, što upućuje na rani i snažan toksični učinak koji ne dopušta daljnji rast stanica.

Tijekom izlaganja mikroorganizma toksičnoj tvari može doći do inhibicije rasta biomase, osobito pri visokim početnim koncentracijama supstrata. Poznato je da je cijanid štetan za rastuće stanice te da pri višim koncentracijama može zaustaviti njihov rast i inhibirati ključne metaboličke procese [11]. **Slika 23** prikazuje učinak različitih koncentracija cijanida na inhibiciju rasta bakterije *Pseudomonas putida*.



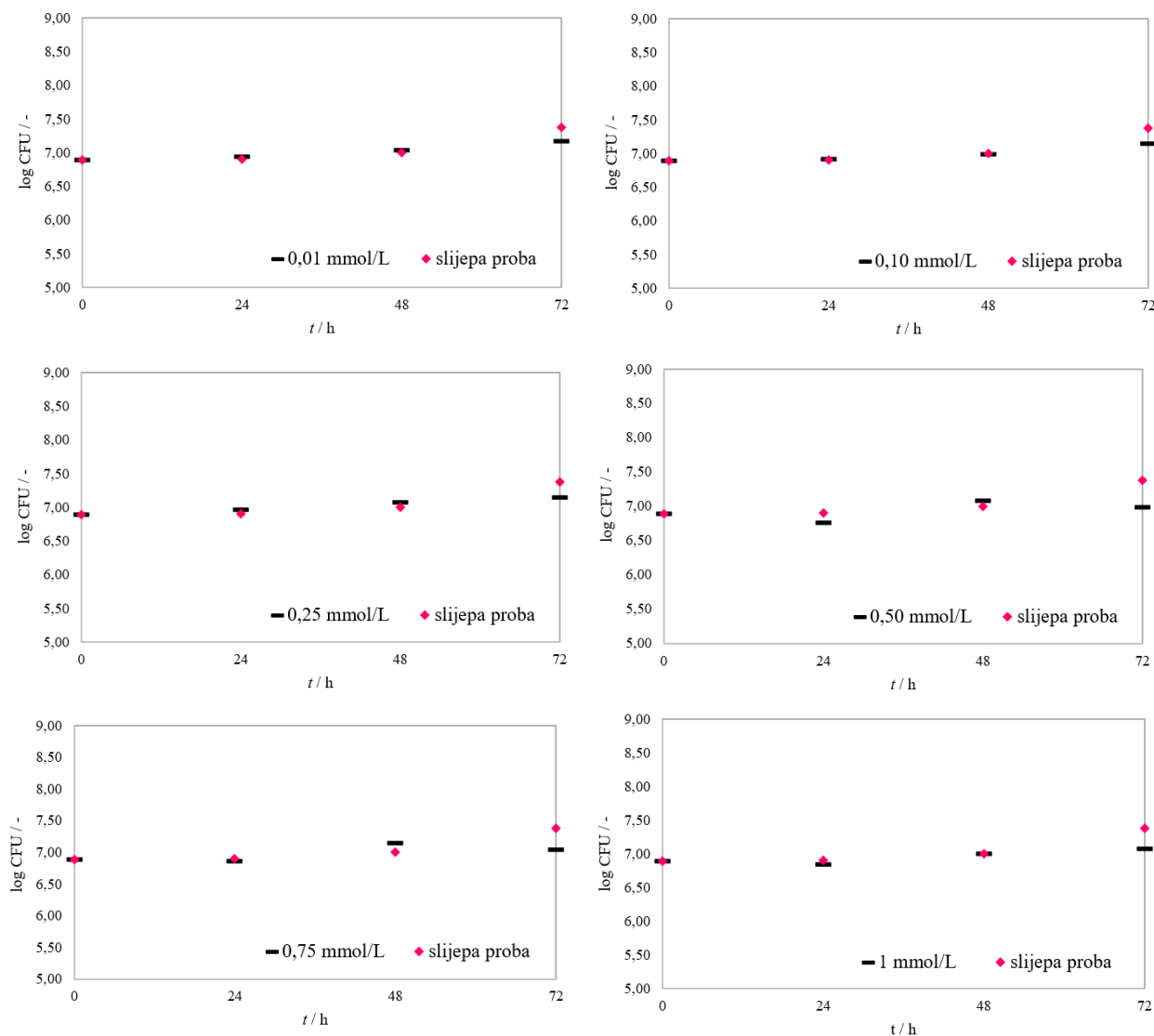
Slika 23 Ovisnost inhibicije rasta *Pseudomonas putida* o koncentraciji cijanida

Promatrajući toksični učinak cijanida na bakteriju *Pseudomonas putida* kroz parametar inhibicije rasta, najsnažniji učinci zabilježeni su tijekom prva 24 h izloženosti. Koncentracije od 0,75 mmol/L i 1,00 mmol/L cijanida uzrokovale su inhibicije rasta od 72,07 % i 74,77 %. Nakon 48 h, inhibicija rasta pri istim koncentracijama gotovo se prepоловила i iznosila je 36,73 % i 45,92 %. Vrlo slične vrijednosti zabilježene su i nakon 72 h, 42,27 % i 42,27 %, redom. Iako je ukupan broj kolonija nakon 72 h bio manji nego nakon 24 h ili 48 h, taj podatak u kontekstu izračuna inhibicije nije relevantan, budući da se inhibicija računa isključivo na temelju razlike između broja kolonija u kontrolnom uzorku i onih u uzorku s cijanidom u istom vremenskom trenutku. Najizraženija inhibicija zabilježena nakon 24 h sugerira da toksičnost cijanida prema *Pseudomonas putida* djeluje vrlo brzo i da bakterija, ako preživi inicijalni stres, razvija određeni stupanj tolerancije ili detoksikacijskih mehanizama.

Iako je cijanid anorganska tvar čiji je primarni mehanizam djelovanja vezan uz inhibiciju citokrom c oksidaze i posljedičnu blokadu staničnog disanja, poznato je da *Pseudomonas putida* u stresnim uvjetima aktivira niz nespecifičnih obrambenih mehanizama koji pridonose otpornosti na kemijski stres [128]. Organizam s vremenom razvija određeni stupanj fiziološke prilagodbe koji omogućuje preživljavanje unatoč prisutnosti toksične tvari.

Utjecaj tiocijanata na *Pseudomonas putida*

Slika 24 prikazuje rezultate toksičnosti tiocijanata za bakteriju *Pseudomonas putida* u koncentracijskom rasponu od 0,01 mmol/L do 1 mmol/L. Rezultati su prikazani u obliku grafikona, kao ovisnost logaritamske CFU vrijednosti o vremenu.



Slika 24 Promjene logaritamske CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas putida* tijekom vremena pri izloženosti različitim koncentracijama tiocijanata

Za razliku od fenola i cijanida, izlaganje bakterijske kulture *Pseudomonas putida* tiocijanatu nije rezultiralo jasnim toksičnim učinkom u okviru testiranih koncentracija. Tijekom svih vremenskih točaka (24 i 48 h), zabilježene vrijednosti inhibicije bile su niske ili negativne, dok za 72 h nisu dostupni podaci zbog nemogućnosti pouzdanog očitavanja broja kolonija u kontrolnom uzorku. Negativne vrijednosti inhibicije upućuju na to da je broj živih stanica u

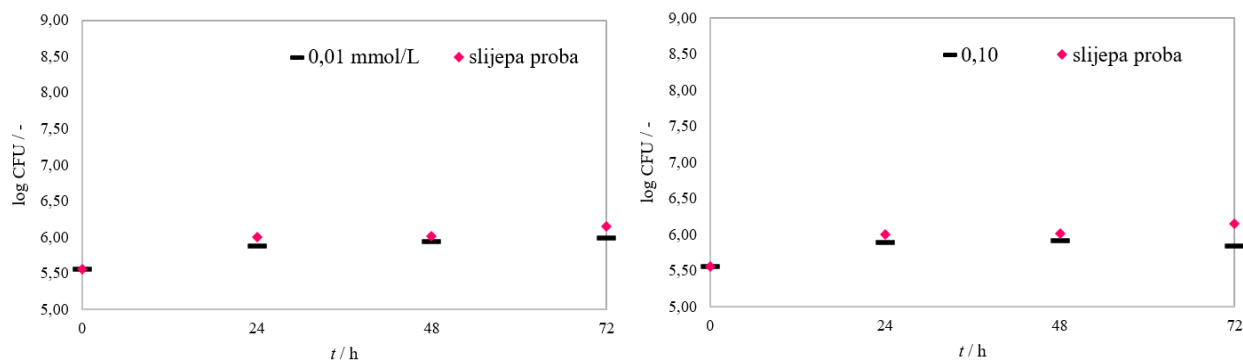
ispitivanim uzorcima bio veći nego u kontrolnoj skupini, što može ukazivati na izostanak toksičnog djelovanja tiocijanata na testni organizam. U kontekstu bakterije *Pseudomonas putida*, moguće je da su ispitivane koncentracije tiocijanata bile ispod praga toksičnosti, a istovremeno su predstavljale dodatni izvor dušika koji bakterije mogu iskoristiti u metaboličke svrhe, čime dolazi do povećanja stope rasta. Osim toga, poznato je da određeni sojevi *Pseudomonas* posjeduju enzimske sustave sposobne za razgradnju tiocijanata, pri čemu ova tvar može djelovati kao supstrat, a ne kao stresor. Takvo ponašanje u skladu je s literaturnim podacima koji ukazuju na bioremedijacijski potencijal *Pseudomonas* vrsta za spojeve koji sadrže dušikove skupine, uključujući i tiocijanat [31, 34]. Zbog navedenih razloga, rezultati za tiocijanat nisu prikazani grafički, budući da ne pokazuju jasno mjerljiv toksični učinak ni u jednoj vremenskoj točki. Ipak, njihov doprinos je značajan u kontekstu razumijevanja specifične interakcije između ispitivane tvari i mikroorganizma, osobito u ekološkim scenarijima gdje bi tiocijanat mogao imati manji utjecaj na mikrobne zajednice u usporedbi s fenolom i cijanidom.

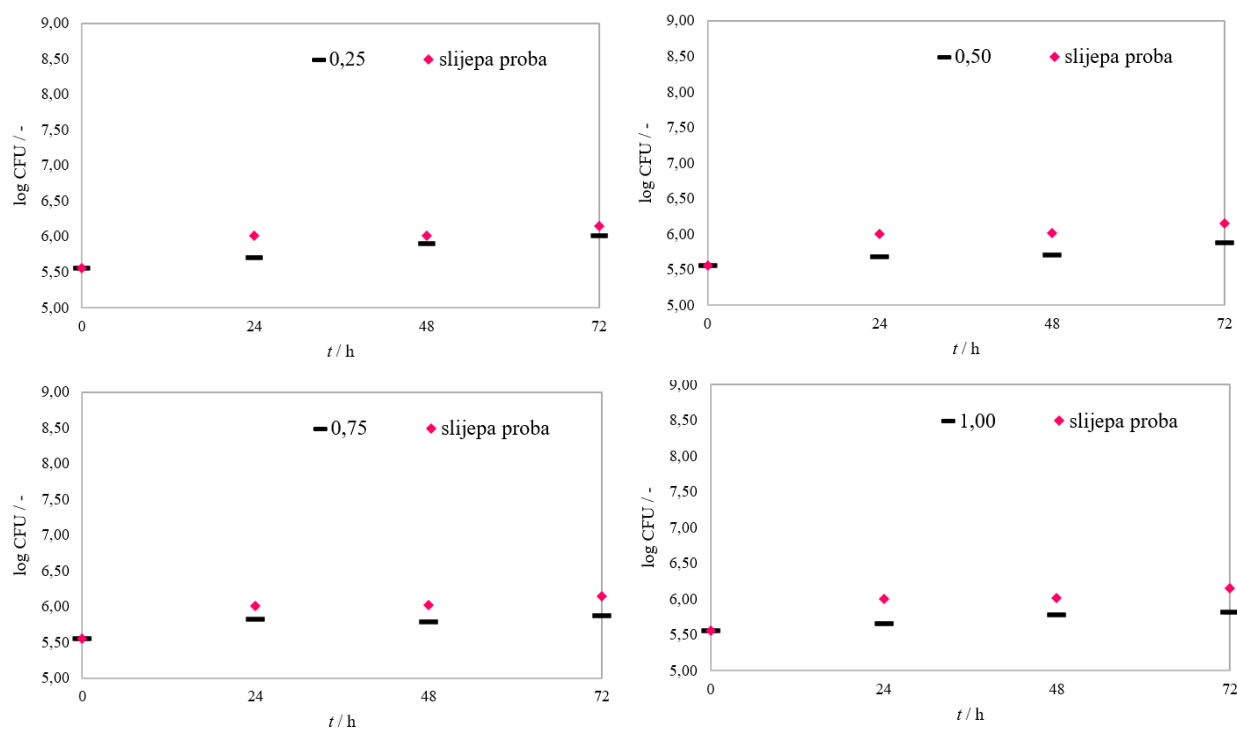
4.1.3. Rezultati testa toksičnosti s *Chlorella* sp.

Ispitivanje toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata provedeno je na mikroalgi *Chlorella* sp. u trajanju od 72 h pri različitim koncentracijama toksičnih tvari. Rezultati su izraženi kao inhibicija rasta, a procijenjene su i EC_{20} te EC_{50} vrijednosti (Tablica 27).

Utjecaj fenola na *Chlorella* sp.

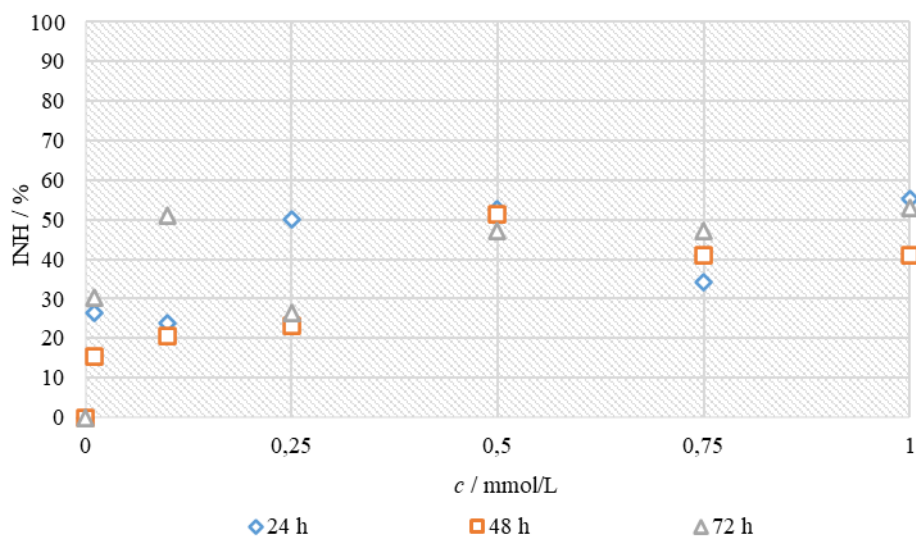
Slika 25 prikazuje rezultate toksičnosti fenola za mikroalgu *Chlorella* sp. u koncentracijskom rasponu od 0,01 mmol/L do 1 mmol/L. Rezultati su prikazani u obliku grafikona, kao ovisnost logaritamske CFU vrijednosti o vremenu.





Slika 25 Promjene logaritamske CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. tijekom vremena pri izloženosti različitim koncentracijama fenola

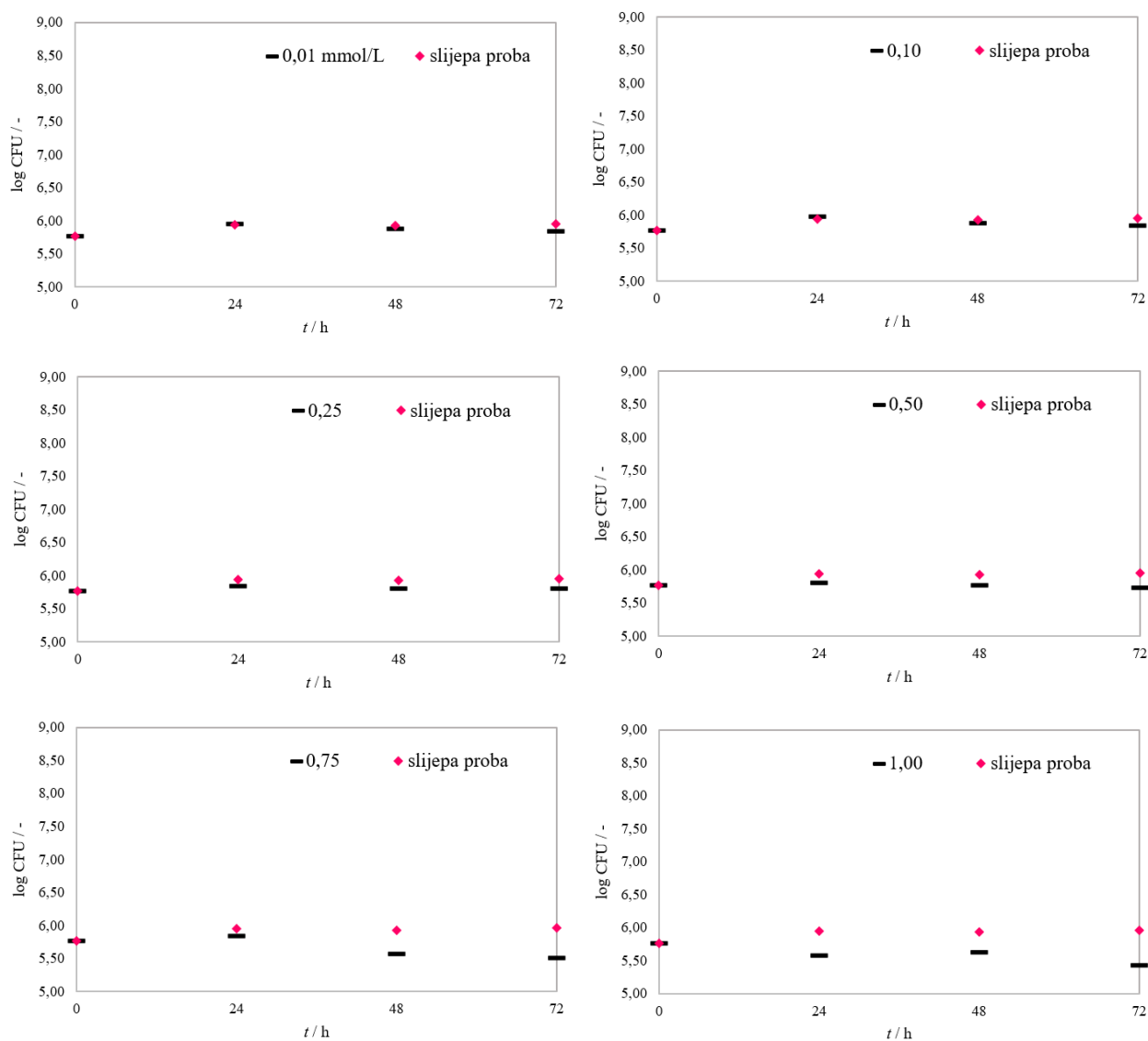
Tijekom izloženosti mikroalge *Chlorella* sp. fenolu nije uočen jasan i dosljedan trend inhibicije rasta. Budući da je broj kolonija u svim uzorcima s fenolom manji u odnosu na kontrolu, inhibicija očigledno postoji, no nije moguće s pouzdanošću tvrditi da dulje vrijeme izlaganja dovodi do većeg stupnja inhibicije, niti da više koncentracije fenola uzrokuju proporcionalno jače inhibicijske učinke. Dobiveni rezultati pokazuju znatne varijacije bez jasnog obrasca, što onemogućuje identifikaciju predvidivog mehanizma djelovanja. Unatoč odsustvu trenda, može se sa sigurnošću utvrditi da već i najniža ispitivana koncentracija fenola (0,01 mmol/L) dovodi do smanjenja broja kolonija u odnosu na kontrolu. Pri koncentraciji od 1,00 mmol/L broj kolonija bio je gotovo dvostruko manji, no takav učinak nije pratio linearan porast s koncentracijom. **Slika 26** prikazuje učinak različitih koncentracija fenola na inhibiciju rasta mikroalge *Chlorella* sp..



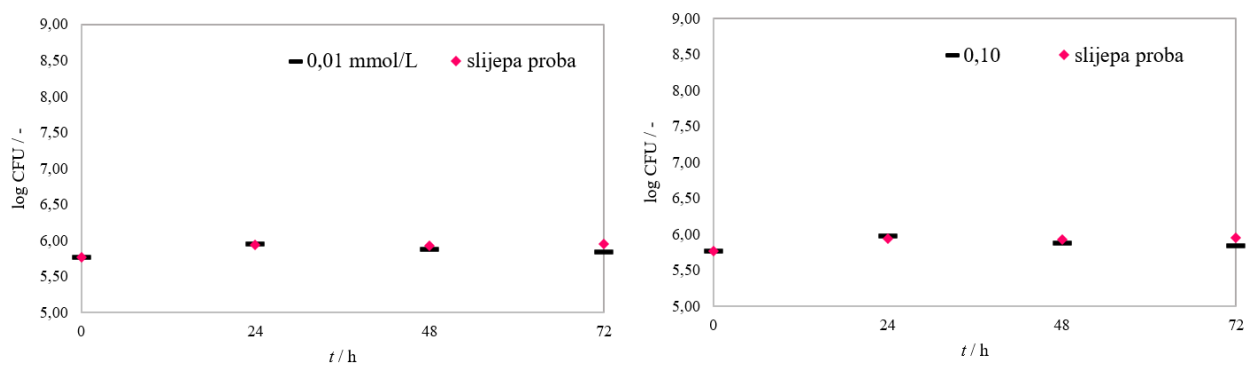
Slika 26 Ovisnost inhibicije rasta *Chlorella* sp. o koncentraciji fenola

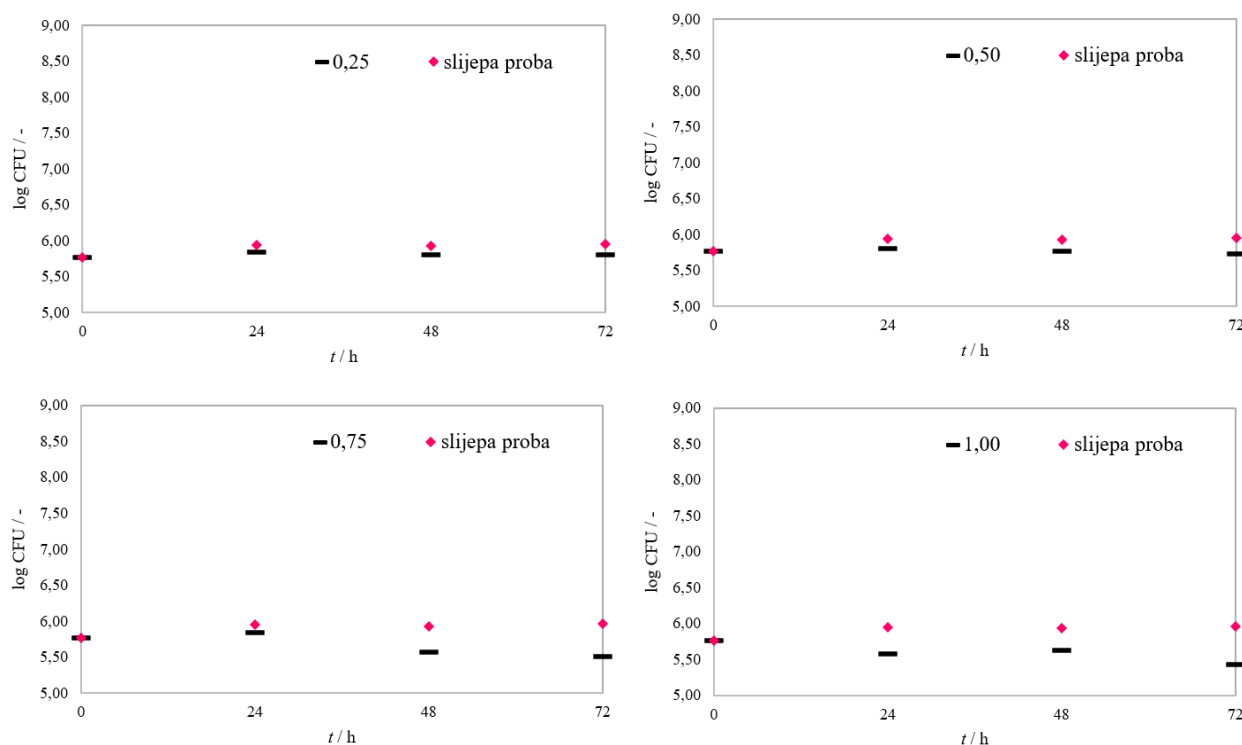
Analizirajući inhibiciju rasta *Chlorella* sp. uzrokovanu fenolom, uočena je osjetljivost ovog organizma na fenol. Tijekom prva 24 h, inhibicija od 50,00 % pojavljuje se već pri relativno niskoj koncentraciji fenola od 0,25 mmol/L. Kada se ove vrijednosti inhibicije usporede s rezultatima za *Pseudomonas putida*, jasno je da je *Chlorella* sp. tijekom prva 24 h osjetljivija na fenol od *Pseudomonas putide*. Rezultati nakon 48 h i 72 h vrlo su slični onima nakon 24 h. Duljim vremenom izlaganja primjećuje se blago pojačan inhibicijski učinak, ali ne za sve koncentracije, pri čemu se manje razlike mogu pripisati i tehničkim pogreškama. S obzirom da fenol potiče stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, tolerancija na oksidacijska oštećenja stanica od iznimne je važnosti. Stoga uočena nelinearnost u obrascima inhibicije može biti posljedica djelovanja antioksidacijskih enzima superoksid-dismutaze, katalaze i peroksidaze, čija je aktivnost zabilježena kod soja *Chlorella* sp. L5 pri izloženosti fenolu. Nasuprot tome, u soju *Chlorella* sp. L3 navedene enzimске aktivnosti nisu detektirane pod istim eksperimentalnim uvjetima, što ukazuje na specifične razlike u antioksidacijskom odgovoru među sojevima [129].

Utjecaj cijanida na *Chlorella* sp.



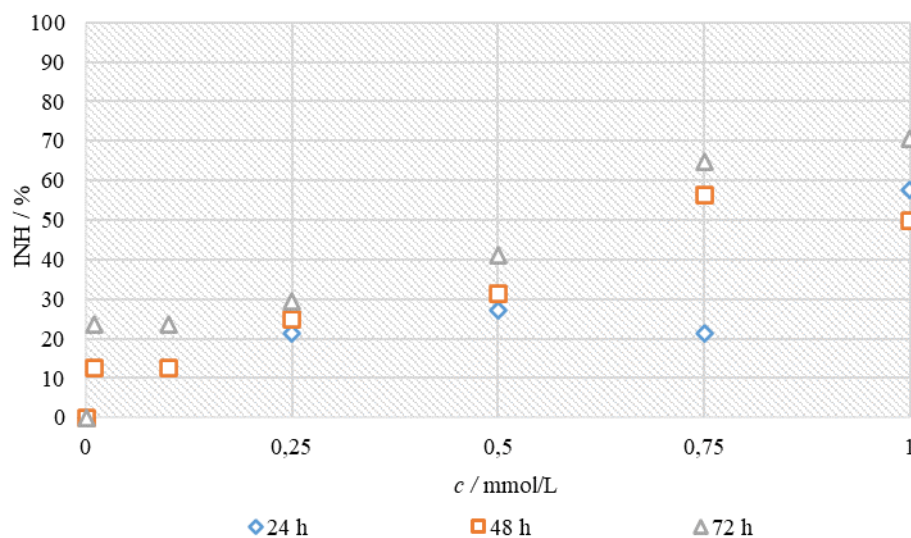
Slika 27 prikazuje rezultate toksičnosti cijanida za mikroalgu *Chlorella* sp. u koncentracijskom rasponu od 0,01 mmol/L do 1 mmol/L. Rezultati su prikazani u obliku grafikona, kao ovisnost logaritamske CFU vrijednosti o vremenu.





Slika 27 Promjene logaritamske CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. tijekom vremena pri izloženosti različitim koncentracijama cijanida

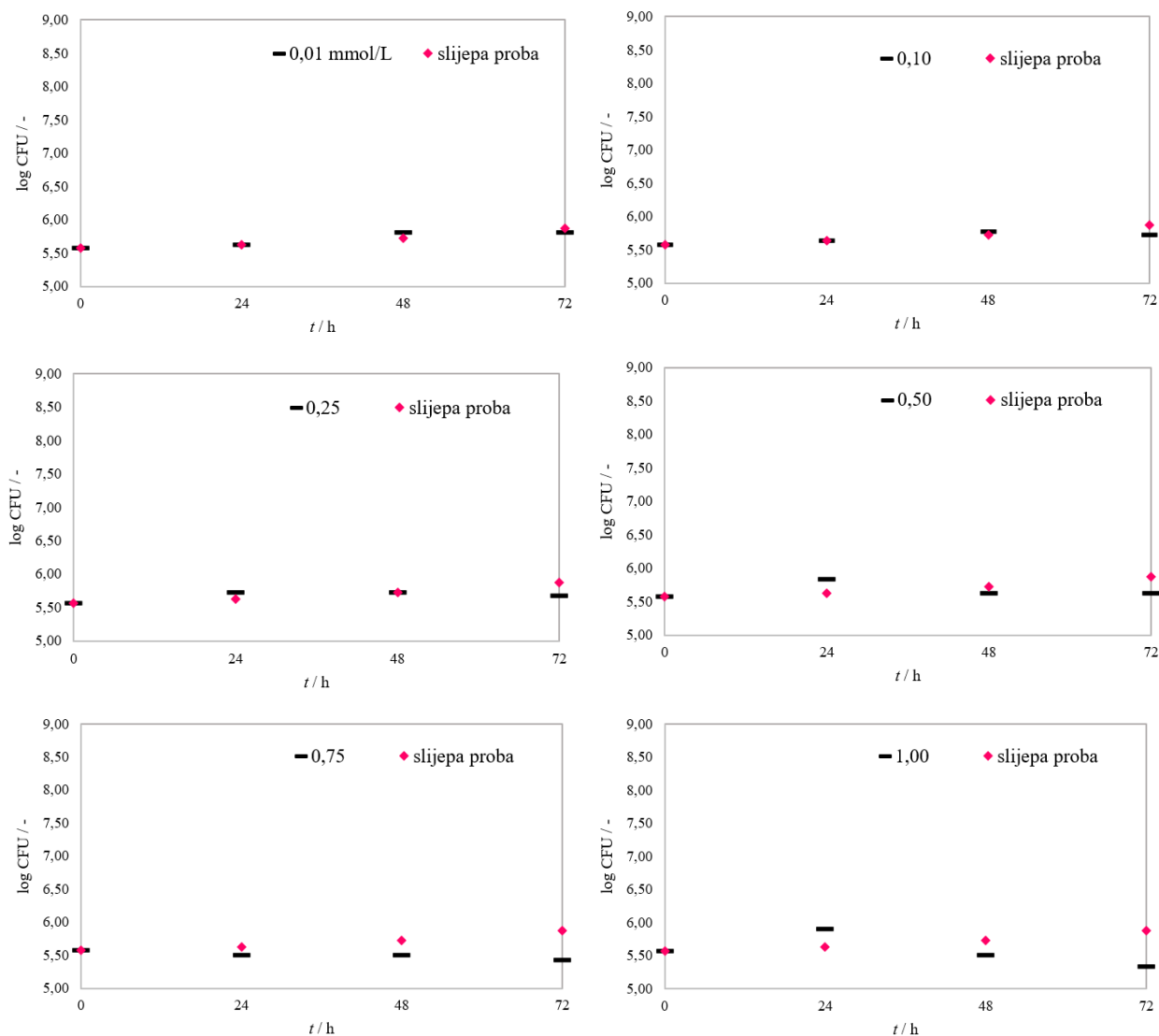
Rezultati ispitivanja utjecaja cijanida na mikroalgu *Chlorella* sp. pokazuju izraženu koncentracijsku i vremensku ovisnost, ali s drugačijim obrascem u odnosu na fenol. Zanimljivo je da tijekom prva 24 h pri najnižim koncentracijama cijanida (0,01 i 0,10 mmol/L) dolazi do porasta broja kolonija unatoč prisutnosti stresora. Pri koncentraciji cijanida od 0,25 mmol/L broj kolonija ostaje konstantan kroz sve tri vremenske točke (24 h, 48 h i 72 h) i iznosi $6,4 \times 10^5$ CFU/mL. Daljnje povećanje koncentracije cijanida rezultira blagim padom broja kolonija, koji je najmanje izražen tijekom prva 24 h, dok s produljenjem izloženosti dolazi do značajnijeg smanjenja broja kolonija. Najmanji broj kolonija mikroalge zabilježen je pri najvišim koncentracijama cijanida i najdužem trajanju izloženosti. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Liu i sur. [70]. Koncentracija KCN od 0,1 mg/L imala je pozitivan učinak na rast mikroalge *Chlorella vulgaris* i sintezu klorofila što potvrđuje stimulirajući učinak niske koncentracije toksične tvari na rast mikroalge. Nakon 72 h izloženosti koncentraciji od 0,1 mg/L, broj kolonija bio je 1,4 puta veći u odnosu na kontrolu. Međutim, pri koncentracijama cijanida od 1, 10, 50 i 100 mg/L, broj stanica mikroalge smanjio se na 48 %, 43 %, 33 % i 25 % kontrolne vrijednosti [70]. **Slika 28** prikazuje učinak različitih koncentracija cijanida na inhibiciju rasta mikroalge *Chlorella* sp..



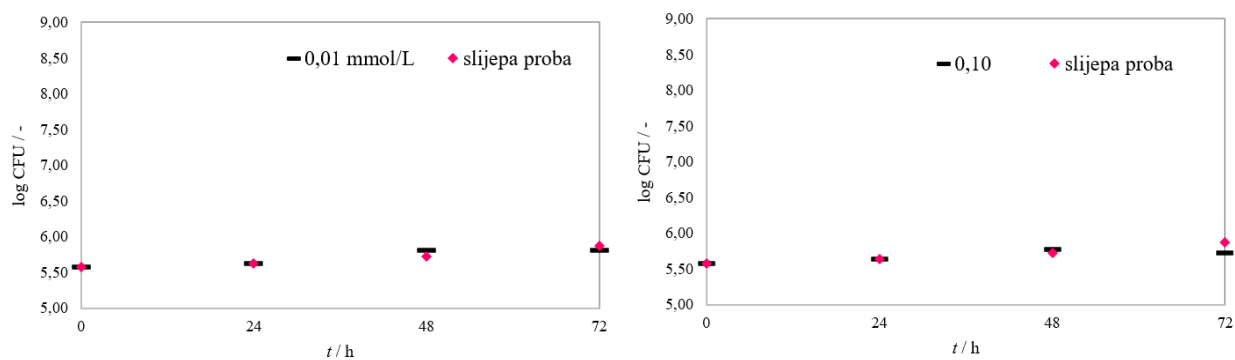
Slika 28 Ovisnost inhibicije rasta *Chlorella* sp. o koncentraciji cijanida

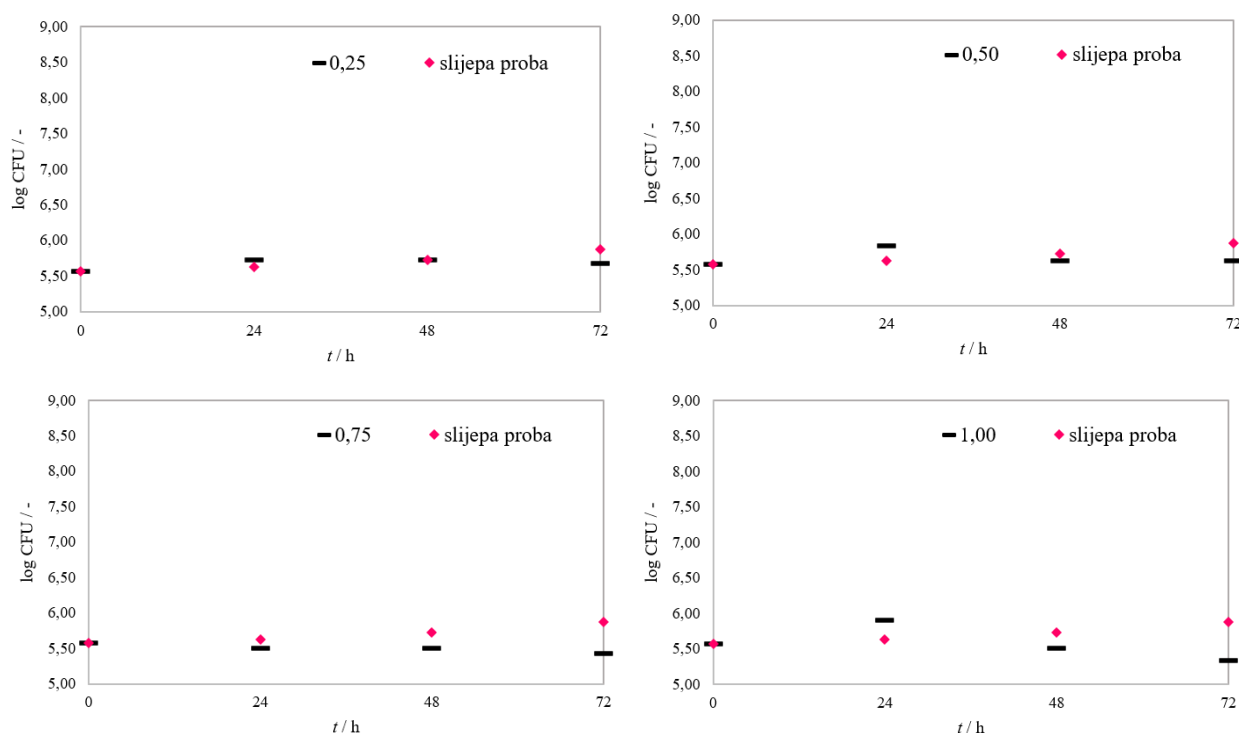
Izračunate vrijednosti inhibicije rasta dodatno pojašnjavaju dinamiku toksičnog djelovanja cijanida i otkrivaju specifične obrasce ovisne o koncentraciji i vremenu izloženosti. Najizraženiji toksični učinak zabilježen je pri koncentracijama cijanida od 0,75 mmol/L i 1,00 mmol/L, pri čemu dolazi do visokog stupnja inhibicije rasta mikroalge u sve tri vremenske točke. Primijećeno je da iste koncentracije cijanida uzrokuju veće inhibicije rasta ako je vrijeme izloženosti dulje što ukazuje na smanjenu otpornost mikroalge na produljeni stres. Najveći inhibicijski učinak zabilježen je pri koncentraciji cijanida od 1,00 mmol/L i to 57,58 % nakon 24 h, 50,00 % nakon 48 h te 70,59 % nakon 72 h. Opaženi obrasci mogu se objasniti poznatim fiziološkim odgovorima *Chlorella vulgaris* na prisutnost cijanida, uključujući aktivaciju antioksidacijskih enzima poput superoksid-dismutaze, smanjenje razine lipidne peroksidacije te konverziju toksičnih iona u netoksične produkte. Niske koncentracije cijanida mogu imati čak i blago stimulativan učinak na rast i sintezu klorofila, dok visoke koncentracije narušavaju integritet stanične membrane i dovode do izraženog inhibicijskog učinka [70].

Utjecaj tiocijanata na *Chlorella* sp.



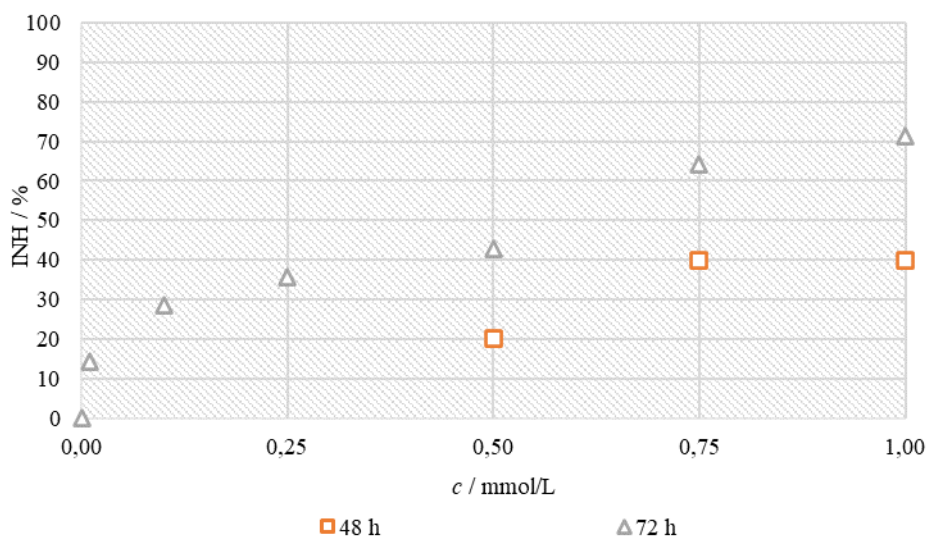
Slika 29 prikazuje rezultate toksičnosti tiocijanata za mikroalgu *Chlorella* sp. u koncentracijskom rasponu od 0,01 mmol/L do 1 mmol/L. Rezultati su prikazani u obliku grafikona, kao ovisnost logaritamske CFU vrijednosti o vremenu.





Slika 29 Promjene logaritamske CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. tijekom vremena pri izloženosti različitim koncentracijama tiocijanata

Promjene u broju kolonija tijekom prva 24 h ukazuju na stimulirajući, umjesto na toksičan, učinak tiocijanata na rast mikroalge. Za svaku koncentraciju tiocijanata, broj kolonija veći je od kontrole, osim za koncentraciju tiocijanata od 0,75 mmol/L, no to se odstupanje može pripisati analitičkoj pogrešci. Razlika u broju kolonija između uzorka s najvišom koncentracijom tiocijanata (1 mmol/L) nakon 24 h izlaganja ($8,0 \times 10^5$ CFU/mL) i kontrolnog uzorka nakon 48 h izlaganja ($5,3 \times 10^5$ CFU/mL) jasno potvrđuje stimulirajući učinak tiocijanata na mikroalgu. Nakon 48 h izlaganja, i dalje se primjećuje porast broja kolonija pri nižim koncentracijama tiocijanata (0,01 – 0,25 mmol/L), no pri višim koncentracijama tiocijanata (0,50 – 1,00 mmol/L) dolazi do blagog smanjenja broja kolonija. Tijekom 72 h izlaganja vidljivo je gotovo linearno smanjenje broja kolonija s povećanjem koncentracije tiocijanata. **Slika 30** prikazuje učinak različitih koncentracija tiocijanata na inhibiciju rasta mikroalge *Chlorella* sp..



Slika 30 Ovisnost inhibicije rasta *Chlorella* sp. o koncentraciji tiocijanata

Inhibicija rasta, izračunata iz razlike broja kolonija uzoraka s tiocijanatom i kontrole, jasno ukazuje na odsutnost toksičnog učinka tiocijanata tijekom prva 24 h. Da bi se postigla minimalna inhibicija rasta, potrebno je dulje izlaganje mikroalge tiocijanatu. Na primjer, koncentracija tiocijanata od 0,50 mmol/L uzrokovala je 20 % inhibicije rasta nakon 48 h. S druge strane, nakon 72 h, već je i minimalna koncentracija tiocijanata (0,01 mmol/L) uzrokovala inhibiciju rasta od 14,29 %. Ta je inhibicija gotovo linearno rasla s povećanjem koncentracije tiocijanata. Ovakav obrazac ukazuje na odgođen i kumulativan učinak tiocijanata, koji postaje izražen tek nakon duljeg razdoblja izloženosti. Iako ne postoji izravna literatura o učincima tiocijanata na mikroalge u izoliranim sustavima, rezultati Ryu i sur. [72] doprinose razumijevanju problematike. U njihovom istraživanju primijenjen je dvostupanjski sustav biorazgradnje tiocijanata, u kojemu su bakterije i mikroalge koegzistirale. Tijekom prve faze, provedene pod litotrofnim uvjetima, autotrofne bakterije razgradile su tiocijanat do amonijaka. Amonijak su zatim oksidirale nitrificirajuće bakterije u nitrit (NO_2^-), a potom u nitrat (NO_3^-). Taj proces trajao je približno 168 h, tijekom kojih je tiocijanat potpuno uklonjen iz sustava. Nakon završetka litotrofne faze, eksperimentalni uvjeti su promijenjeni tako da favoriziraju rast mikroalgi povećanjem intenziteta svjetlosti. U tim novim uvjetima dominaciju u sustavu preuzele su mikroalge, koje su tada počele iskorištavati prethodno nastale oksidirane oblike dušika za vlastiti rast. To je potvrđeno porastom koncentracije klorofila a i broja mikroalgi. Ovi rezultati jasno ukazuju na to da mikroalge same ne sudjeluju u razgradnji tiocijanata, već dolaze do izražaja tek nakon što bakterije prethodno pretvore tiocijanat u oblike dušika koje su mikroalgama bioraspoložive. Sinergija između bakterija i mikroalgi pritom se pokazala

učinkovito ne samo za potpunu razgradnju tiocijanata, već i za održavanje stabilnosti mikrobne zajednice tijekom cijelog procesa [72].

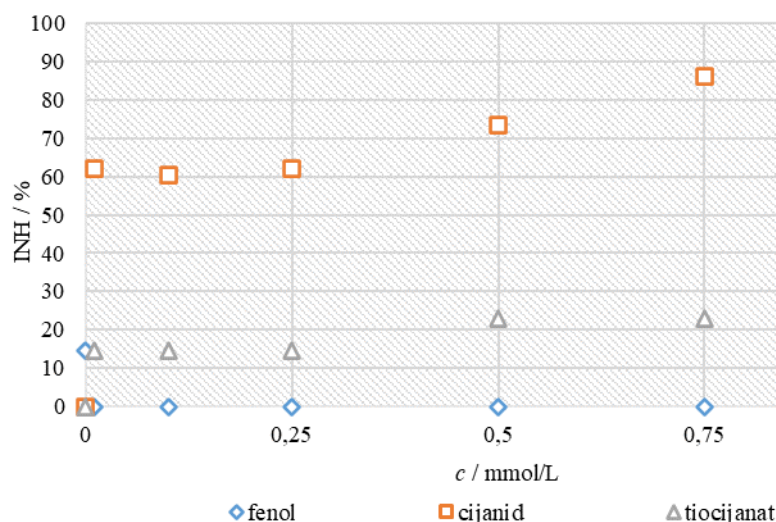
S obzirom na to da se u ovom istraživanju mikroalga *Chlorella* sp. nalazila u sustavu bez prethodne bakterijske konverzije tiocijanata, odgođena inhibicija rasta može biti posljedica kumulacije toksičnih iona, izostanka raspoloživog dušika za metabolizam, ili narušavanja fiziološke ravnoteže stanica tijekom dulje izloženosti. U tom je smislu moguće da mikroalga, u odsutnosti pretvorbe tiocijanata u bioraspoložive oblike, ne pokazuje toksični odgovor odmah, već tek nakon što metabolički stres premaši kapacitet prilagodbe. Takav oblik latentne toksičnosti ukazuje na važnost višednevnih testova, budući da bi kraći testovi mogli podcijeniti stvarni toksični potencijal tiocijanata prema mikroalgama.

4.1.4. Rezultati testa toksičnosti s *Lemna minor*

Ispitivanje toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata provedeno je na vodenoj leći *Lemna minor* u trajanju od 7 dana pri različitim koncentracijama toksičnih tvari. Rezultati su izraženi kao inhibicija rasta, što je praćeno brojanjem listića. Osim toga, testiran je i utjecaj koncentracije toksičnih tvari na duljinu korijena vodene leće i sadržaj klorofila. Izračunate su i EC₂₀ te EC₅₀ vrijednosti (**Tablica 27**).

Inhibicija rasta vodene leće

Slika 31 prikazuje inhibiciju rasta *Lemna minor*, izraženu kao postotak smanjenja broja listića u odnosu na kontrolu, nakon sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama fenola, cijanida i tiocijanata.



Slika 31 Ovisnost inhibicije rasta *Lemna minor* o koncentraciji fenola, cijanida i tiocijanata

Iako je osjetljivost biljaka roda *Lemna* na fenolne spojeve već dokumentirana [36], u ovom istraživanju fenol tijekom sedmodnevnog testa nije izazvao nikakvu mjerljivu inhibiciju rasta *Lemna minor*, čak ni pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 1,00 mmol/L. Takav rezultat ukazuje na moguću varijabilnost osjetljivosti unutar samog roda *Lemna*, što može biti posljedica genetskih ili ekoloških razlika među vrstama. S druge strane, vodene leće sve su češće prepoznate kao organizmi velikog bioremedijacijskog potencijala koji proizlazi iz specifičnih morfoloških i fizioloških značajki. Naime, *Lemna minor* ima tijelo talusnog oblika, bez jasno diferenciranih listova i stabljike, što joj omogućuje vrlo efikasan način vegetativnog razmnožavanja putem pupanja [130]. Ta sposobnost brzog i kontinuiranog razmnožavanja u optimalnim uvjetima rezultira stvaranjem velike količine biomase u kratkom vremenskom razdoblju, što ju čini pogodnom za primjenu u sustavima za obradu otpadnih voda s visokim sadržajem organskih tvari.

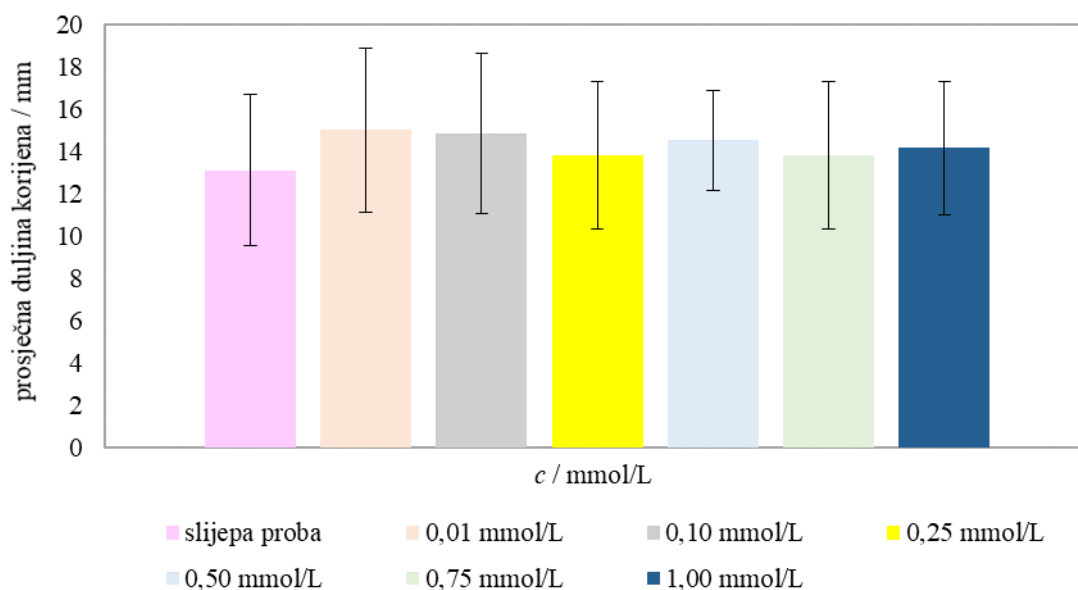
Osim vlastitih fizioloških mehanizama, bioremedijacijski potencijal vodenih leća dodatno je podržan djelovanjem mikrobnih zajednica u njihovoj rizosferi (mikrookolišu oko korijena). Genetska struktura mikrobiote povezane s rizosferom značajno varira među različitim ekotipovima *Lemna minor* i određena je ekološkim čimbenicima. No, čini se da je prisutnost bakterija koje razgrađuju fenol jedan od rijetkih zajedničkih nazivnika, jer vodene leće, poput svih drugih biljaka, svojim prirodnim fenolnim izlučevinama privlače upravo te bakterije. Rizosfera se tek nedavno počela prepoznavati kao vrijedan izvor bakterija koje razgrađuju fenol [131].

Cijanid je pokazao izrazito snažan inhibitorni učinak na rast *Lemna minor*, pri čemu je već na najnižoj testiranoj koncentraciji (0,01 mmol/L) zabilježena inhibicija od 61,93 %, dok je pri višim koncentracijama (0,50 – 1,00 mmol/L) inhibicija dostizala vrijednosti od 73,54 % do 86,17 %. Ovakav intenzitet i stabilnost odgovora sugeriraju akutnu toksičnost cijanida, bez izraženog praga tolerancije. Mehanizam djelovanja cijanida temelji se na njegovoj sposobnosti da ireverzibilno inhibira citokrom c oksidazu, ključni enzim u mitohondrijskom respiratornom lancu. Kao posljedica toga, u stanicama *Lemna minor* može doći do smanjene proizvodnje kisika tijekom fotosinteze, poremećene sinteze adenozin trifosfata (ATP) i gubitka membranskog potencijala. Ove promjene dovode do energetske deficita i ukupne fiziološke disfunkcije stanica, što objašnjava izraženu osjetljivost *Lemna minor* na cijanid [132].

Tiocijanat je izazvao umjereno izraženu, ali koncentracijski ovisnu inhibiciju rasta, u rasponu od 14,71 % (pri 0,01 mmol/L) do 31,80 % (pri 1,00 mmol/L). Rezultati inhibicije rasta *Lemna minor* u prisutnosti tiocijanata ukazuju na toksični učinak SCN⁻ iona, koji se može tumačiti kao oblik alelopatskog djelovanja, s obzirom na to da ometa rast biljnog organizma s kojim dolazi u izravan kontakt. Takav učinak vjerojatno proizlazi iz sposobnosti tiocijanata da perzistira u okolišu i postupno interferira s osnovnim fiziološkim procesima, poput metabolizma dušika, staničnog disanja ili sinteze fotosintetskih pigmenata [133]. Iako točan mehanizam djelovanja nije razjašnjen, rezultati sugeriraju da čak i relativno niske koncentracije tiocijanata mogu uzrokovati izražen fiziološki stres i inhibiciju rasta. U usporedbi s cijanidom, inhibicijski učinak tiocijanata raste sporije i ne doseže isti intenzitet, što ukazuje na manje akutno, ali ipak prisutno djelovanje. S obzirom na to da su najviši postoci inhibicije zabilježeni tek pri 0,75 i 1,00 mmol/L, može se pretpostaviti da *Lemna minor* posjeduje relativno učinkovit sustav tolerancije ili detoksikacije za ovaj spoj, no taj kapacitet postaje preopterećen pri višim razinama izloženosti.

Duljina korijena

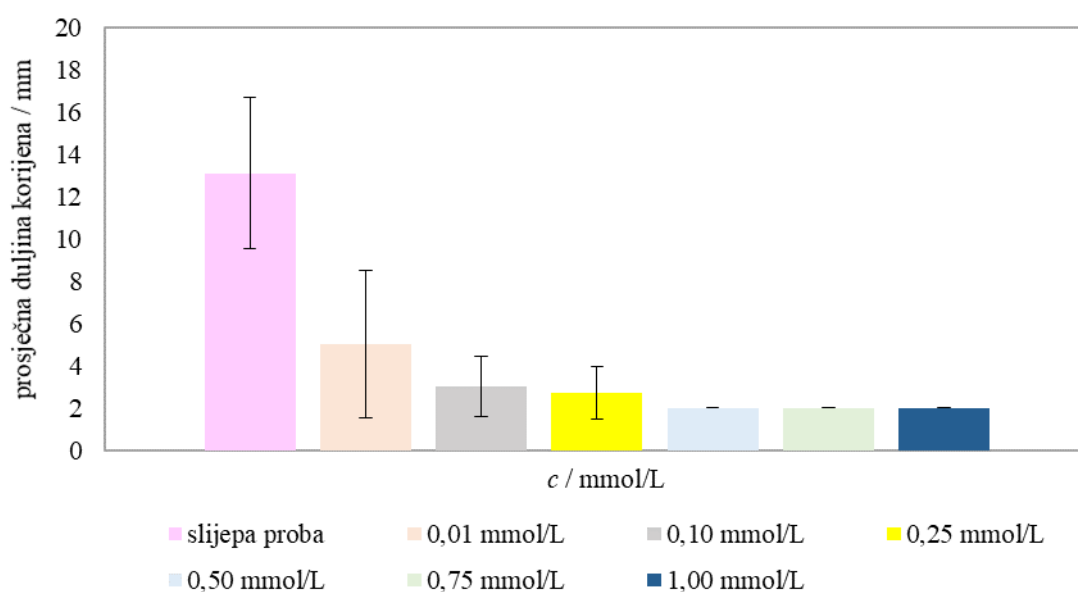
Korijen koji je kod većine biljaka primarno odgovoran za usvajanje hranjivih tvari, kod ove vrste ima nešto drugačiju ulogu. Iako su neka istraživanja pokazala da je unos hranjiva putem korijena slab ili čak nepostojeći te da korijen prvenstveno služi za stabilizaciju biljke u vodi, postoje istraživanja koja navode da *Lemna minor* ipak može apsorbirati značajne količine anorganskog dušika upravo putem korijena [130]. **Slika 32** prikazuje prosječnu duljinu korijena *Lemna minor* nakon sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama fenola (0,01 – 1,00 mmol/L).



Slika 32 Prosječna duljina korijena *Lemna minor* u ovisnosti o koncentraciji fenola

Fenol nije pokazao jasan toksičan učinak na duljinu korijena *Lemna minor* unutar ispitivanog koncentracijskog raspona. U nekim je pokusnim jedinicama zabilježen čak i blagi porast duljine korijena. Na primjer, pri 0,25 mmol/L fenola izmjerena duljina korijena bila je 14,50 mm, što je više od kontrole (13,08 mm). Međutim, razlike nisu bile statistički značajne što ukazuje na odsutnost dosljednog trenda.

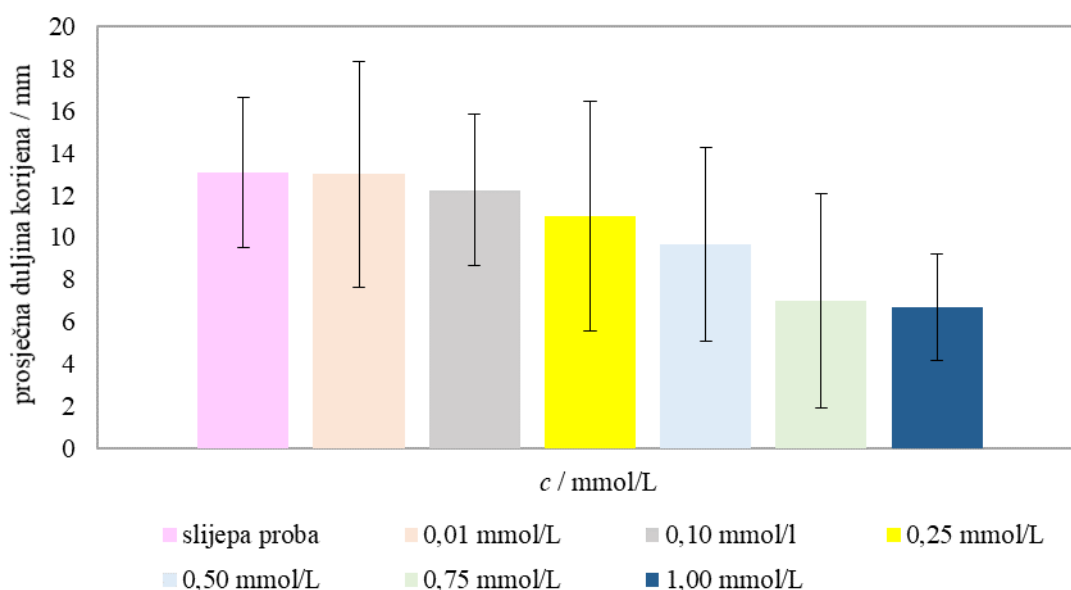
Slika 33 prikazuje prosječnu duljinu korijena *Lemna minor* nakon sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama cijanida (0,01 – 1,00 mmol/L).



Slika 33 Prosječna duljina korijena *Lemna minor* u ovisnosti o koncentraciji cijanida

Već pri 0,01 mmol/L cijanida duljina korijena iznosi 5,00 mm (u odnosu na 13,08 mm u kontroli), a pri višim koncentracijama cijanida ($\geq 0,25$ mmol/L) prosječne vrijednosti padaju ispod 3,00 mm, uz minimalne standardne devijacije. Ovi rezultati ukazuju na izrazitu osjetljivost korijenskog sustava *Lemna minor* na cijanid, uz brzu i stabilnu inhibiciju u cijelom testiranom rasponu. Ovi podaci potvrđuju da je korijen morfološki parametar osjetljiv na cijanid.

Slika 34 prikazuje prosječnu duljinu korijena *Lemna minor* nakon sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama tiocijanata (0,01 – 1,00 mmol/L).



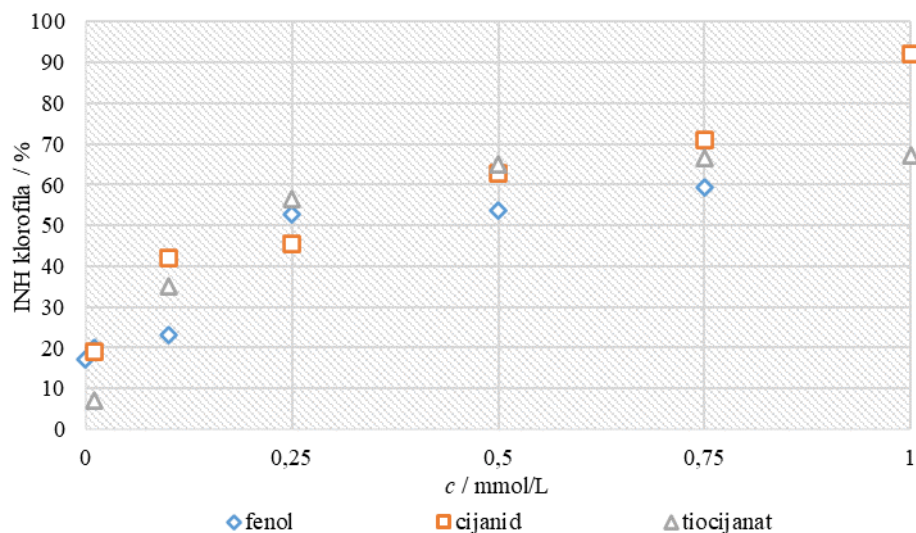
Slika 34 Prosječna duljina korijena *Lemna minor* u ovisnosti o koncentraciji tiocijanata

Za tiocijanat je uočen jasan koncentracijski trend, pri nižim koncentracijama (0,01 i 0,10 mmol/L), duljina korijena ostaje gotovo jednaka kontroli, dok se pri višim koncentracijama tiocijanata ($\geq 0,50$ mmol/L) bilježi značajno smanjenje. Najniže vrijednosti zabilježene su pri 0,75 mmol/L (7,00 mm) i 1,00 mmol/L (6,67 mm), što predstavlja ~ 50 % smanjenja duljine u odnosu na kontrolu. U odnosu na fenol, tiocijanat pokazuje izraženiji negativni učinak na korijen, no za razliku od cijanida, potreban je veći raspon koncentracija da bi se postigla značajna inhibicija.

Inhibicija klorofila

Smanjenje fotosintetskih pigmenata kod *Lemna minor* tijekom rasta u onečišćenim vodenim okolišima omogućili su njezinu primjenu kao učinkovitog bioindikatora za otkrivanje toksičnih tvari u vodenim tijelima [130]. **Slika 35** prikazuje inhibiciju sadržaja ukupnog klorofila u

listićima *Lemna minor* nakon sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama fenola, cijanida i tiocijanata. Rezultati pokazuju izražene razlike u intenzitetu i obrascu toksičnog djelovanja između ispitivanih tvari.



Slika 35 Ovisnost inhibicije klorofila o koncentraciji fenola, cijanida i tiocijanata

Fenol je izazvao koncentracijski ovisno smanjenje sadržaja ukupnog klorofila, pri čemu je inhibicija već pri 0,01 mmol/L iznosila 17,17 %, a pri 1,00 mmol/L porasla na 59,28 %. Iako fenol nije utjecao na broj listića ni na duljinu korijena, njegov učinak na klorofil je bio izražen, što pokazuje da fotosintetski aparat *Lemna minor* reagira osjetljivije od morfoloških parametara. Fenol je očito bio signal za razmnožavanje biljke putem vegetativnog umnažanja čime se osigurava opstanak populacije, ali na račun oštećenja kloroplasta. Fenoli mogu ometati fotosintezu inducirajući proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva koji dovode do oksidacije klorofila. Osim toga, fenol može inhibirati enzime biosinteze klorofila [131]. Zanimljivo je da se ovakav toksični učinak ne očituje u inhibiciji rasta listića, što potvrđuje da *Lemna minor* može održavati rast i u prisutnosti funkcionalno narušenih kloroplasta, barem unutar ispitanog vremena izloženosti. Proces od kloroze do nekroze koji završava raspadom listića prepoznat je kao tipičan simptom toksičnosti kod *Lemna* sp. izloženih onečišćujućim tvarima [36].

Cijanid je pokazao najizraženiji toksični učinak na sadržaj klorofila od sve tri ispitivane tvari. Već pri 0,01 mmol/L cijanida, inhibicija je iznosila 61,93 %, a pri 1,00 mmol/L dostizala je i 92,00 %. Ovakva razina inhibicije ukazuje na ekstremnu osjetljivost fotosintetskog aparata na cijanid, znatno veću nego na fenol ili tiocijanat. Zabilježena inhibicija sadržaja klorofila već pri koncentraciji od 0,01 mmol/L cijanida može se objasniti poznatim mehanizmom inhibicije mitohondrijske respiracije. Cijanid blokira djelovanje citokrom c oksidaze, čime dolazi do

smanjene proizvodnje ATP-a i narušavanja energetskeg statusa stanice. Budući da su biosinteza i stabilnost fotosintetskih pigmenata visoko ovisni o dostupnosti energije, takva mitohondrijska disfunkcija može posredno uzrokovati pad sadržaja klorofila u biljnom tkivu [132].

Tiocijanat je izazvao umjerenu, ali postojanu inhibiciju klorofila s koncentracijskom ovisnošću od 7,19 % pri 0,01 mmol/L do 67,22 % pri 1,00 mmol/L. Ovakav uzorak pokazuje da tiocijanat ima značajan učinak na pigmentaciju, ali slabiji od cijanida. Visoka razina inhibicije sinteze klorofila zabilježena u prisutnosti tiocijanata može se objasniti sposobnošću SCN⁻ iona da kelira željezo, čime se smanjuje njegova bioraspoloživost u biljnom tkivu. Budući da je željezo ključan kofaktor u biosintezi klorofila i u funkcioniranju enzima kloroplasta, njegov nedostatak može rezultirati inhibicijom fotosintetskog otpuštanja kisika. U literaturi je također opisano da tiocijanat može uzrokovati poremećaj fotokemijske faze fotosinteze, uključujući inhibiciju Hillove reakcije i smanjenu aktivnost kloroplasta [133].

Komparativna analiza toksičnog učinka fenola, cijanida i tiocijanata na *Lemna minor*

Rezultati jasno potvrđuju da fenol, cijanid i tiocijanat imaju različite mehanizme i intenzitet djelovanja na *Lemna minor*.

Fenol nije izazvao inhibiciju rasta listića ni značajan pad duljine korijena, ali je imao izražen učinak na sadržaj klorofila. To ukazuje na parcijalni učinak, ograničen prvenstveno na fotosintetske procese. Cijanid je najtoksičniji spoj. Izaziva snažnu i trenutačnu inhibiciju svih praćenih parametara, što potvrđuje njegov učinak na respiraciju i fotosintezu. Već pri 0,01 mmol/L dolazi do > 60 % inhibicije rasta i drastičnog smanjenja duljine korijena, kao i inhibicije klorofila. Tiocijanat pokazuje srednju razinu toksičnosti, uz jasnu koncentracijsku ovisnost. Rast listića i korijena inhibiran je tek pri višim koncentracijama ($\geq 0,5$ mmol/L), dok sadržaj klorofila opada ravnomjerno s porastom koncentracije.

Značajno je što je test klorofila pokazao najveću osjetljivost na sve tri ispitivane tvari, što sugerira da je pigmentacija bolji indikator stresa od morfoloških pokazatelja rasta. Uz to, odgovor *Lemna minor* ukazuje na distinkciju između anorganskih i organskih kontaminanata. Dok se fenol uglavnom detoksificira, anorganski ioni cijanida i tiocijanata ometaju temeljne metaboličke procese.

4.1.5. Rezultati testa toksičnosti s *Allium cepa*

Testom klijavosti sa sjemenkama luka *Allium cepa* procijenio se učinak različitih koncentracija fenola, cijanida i tiocijanata na biometrijske parametre biljke poput postotka klijavosti, visine izdanaka te mase svježe i suhe tvari, uz praćenje eventualnih vidljivih morfoloških promjena. Rezultati su izraženi i kao EC₂₀ te EC₅₀ vrijednosti (**Tablica 27**).

Kako prikazuje **Tablica 23**, klijanje u kontrolnim posudama započelo je šestog dana pokusa. Rast izdanaka odvijao se ujednačeno, s postepenim povećanjem visine do maksimalnih 7,0 cm nakon 21 dan. Masa svježe tvari kretala se od 0,0182 do 0,0270 g, dok je suha tvar varirala između 0,0026 i 0,0186 g, uz 100 % nicanja u svih šest posuda.

Utjecaj fenola na rast *Allium cepa*

Tablica 24 prikazuje rezultate utjecaja fenola na rast *Allium cepa*. Klijanje u prisutnosti najniže koncentracije fenola (0,01 mmol/L) započelo je tek nakon 12 dana, a zabilježeno je 83,3 % nicanja. Kod koncentracija 0,10; 0,25 i 1,00 mmol/L fenola klijalo je samo po jedno sjeme (16,7 %), dok je pri koncentracijama 0,50 i 0,75 mmol/L zabilježena potpuna inhibicija nicanja. Visine izdanaka pokazale su izraženu varijabilnost. Iako se očekivalo da će veće koncentracije imati snažniji inhibicijski učinak na rast, u nekim slučajevima zabilježene su iznenađujuće visoke vrijednosti rasta. Na primjer, pri koncentraciji 0,25 mmol/L izmjerene su visine do 10,6 cm, što premašuje kontrolnu vrijednost. Slična situacija uočena je i pri 1,00 mmol/L fenola, gdje je visina izdanaka dosegla 7,5 cm. Ovakva pojava može se objasniti djelovanjem tzv. hormoneze, fenomena u kojem niske do umjerene razine toksičnih tvari stimuliraju određene fiziološke odgovore [134]. Fenol u subletalnim dozama može potaknuti preusmjeravanje resursa s rasta korijena prema izduživanju hipokotila i epikotila, što je u biljkama poznat obrambeni mehanizam u stresnim uvjetima. Masa svježe tvari kod tretiranih biljaka u pojedinim koncentracijama višestruko premašuje kontrolnu. Međutim, suha tvar bila je manja, što ukazuje na zadržavanje vode u tkivu kao mogući odgovor na osmotski stres. Ova pojava vjerojatno je povezana s promjenama u propusnosti staničnih membrana i osmotskim pritiscima izazvanima fenolom [135]. Makroskopski, izdanci nisu pokazivali znakove oštećenja poput nekroze ili kloroze. To sugerira da je djelovanje fenola u ovom pokusu uglavnom subletalno i ograničeno na staničnu razinu. Njegov mehanizam toksičnosti uključuje denaturaciju proteina, inhibiciju enzima i stvaranje slobodnih radikala uslijed oksidacijskog stresa, čemu doprinose njegova aromatska struktura i prisutnost polarnih funkcionalnih skupina [136].

Tablica 23 Rezultati kontrolnog uzorka

dan	6	8	9	12	13	14	15	17	19	21	<i>m</i> (svježa tvar)	<i>m</i> (suha tvar)	% nicanja
kontrola	visina izdanka [cm]										[g]	[g]	
	1,0	2,5	3,0	3,0	3,5	4,5	4,5	5,5	6,0	7,0	0,0267	0,0172	
	1,0	2,7	3,0	3,5	3,5	4,5	4,6	5,5	6,0	7,0	0,0270	0,0186	
	0,0	1,4	1,9	2,5	3,0	4,0	4,5	5,0	5,8	6,0	0,0221	0,0152	
	0,0	1,2	1,8	2,0	2,7	3,0	3,4	4,5	5,0	6,0	0,0218	0,0154	100,00
	0,0	1,2	1,9	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	0,0216	0,0142	
	0,0	0,3	0,9	1,3	2,0	2,2	2,4	3,0	3,5	5,0	0,0182	0,0026	

Tablica 24 Rezultati testa fitotoksičnosti tijekom izlaganja *Allium cepa* različitim koncentracijama fenola

dan	6	8	9	12	13	14	15	17	19	21	<i>m</i> (svježa tvar)	<i>m</i> (suha tvar)	% nicanja
fenol	visina izdanka [cm]										[g]	[g]	
	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0005	0,0001	
	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0015	0,0006	
0,01 mmol/L	0,0	0,0	0,0	0,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	0,0079	0,0029	83,3
	0,0	0,0	0,0	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1,5	0,0008	0,0003	
	0,0	0,0	0,0	0,1	2,0	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	0,0004	0,0002	
0,10 mmol/L	0,0	0,0	0,5	3,5	4,0	5,0	5,0	6,3	6,3	6,3	0,0501	0,0134	16,7
0,25 mmol/L	0,5	2,5	6,0	8,5	9,0	9,5	9,5	10,6	10,6	10,6	0,0518	0,0175	16,7
0,50 mmol/L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000	0,0000	0,0
0,75 mmol/L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000	0,0000	0,0
1,00 mmol/L	0,0	2,0	5,0	6,0	6,0	6,0	6,0	7,5	7,5	7,5	0,0202	0,0071	16,7

Utjecaj cijanida na rast *Allium cepa*

Tablica 25 prikazuje rezultate utjecaja cijanida na rast *Allium cepa*. Cijanidi su pokazali iznimno visoku toksičnost. Klijanje je bilo ograničeno na koncentracije $\leq 0,25$ mmol/L, s maksimalno jednim prokljalim izdankom po posudi. Pri višim koncentracijama cijanida (0,50 – 1,00 mmol/L) nije zabilježeno klijanje, čime je potvrđena potpuna inhibicija.

Tablica 25 Rezultati testa fitotoksičnosti tijekom izlaganja *Allium cepa* različitim koncentracijama cijanida

dan	9	13	17	19	21	<i>m</i> (svježa tvar)	<i>m</i> (suha tvar)	% nicanja
cijanid	visina izdanka [cm]					[g]	[g]	
0,01 mmol/L	0,0	0,0	0,0	4,0	4,5	0,0151	0,0057	16,7
0,10 mmol/L	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	0,0068	0,0002	16,7
0,25 mmol/L	0,0	0,0	0,5	0,6	0,8	0,0067	0,0001	16,7
0,50 mmol/L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	0,0
0,75 mmol/L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	0,0
1,00 mmol/L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	0,0

Kao i kod fenola, nije zabilježen jasni uzlazni trend inhibicije u ovisnosti o koncentraciji, što se može objasniti eksperimentalnom varijabilnošću ili heterogenoj distribuciji tvari u mediju. Ipak, svi kvantitativni pokazatelji, uključujući visinu izdanaka, masu svježe i suhe tvari, ukazuju na snažnu inhibiciju fizioloških procesa. Ova zapažanja u skladu su s rezultatima Ogunyemija i sur. [137], koji su istraživali toksični učinak cijanidnog ekstrakta iz otpadne vode kasave na *Allium cepa*. Iako u njihovom istraživanju nije bio primijenjen test klijavosti, provedena je detaljna analiza citotoksičnih i genotoksičnih učinaka cijanida na *Allium cepa*, pri čemu su zabilježeni izraženi poremećaji u staničnoj diobi, uključujući značajno smanjenje mitotske aktivnosti te pojavu različitih kromosomskih oštećenja, poput kromosomskih mostova, zaostalih i ljepljivih kromosoma te nepravilnih dioba (c-mitoza).

Budući da se klijanje sjemena i početni rast izdanaka oslanjaju upravo na intenzivnu staničnu diobu u meristematskom tkivu, vrlo je vjerojatno da je potpuna inhibicija klijanja pri višim koncentracijama cijanida u ovom istraživanju rezultat snažnog negativnog učinka cijanida na taj proces. Mitotski indeks, koji pokazuje udio stanica u aktivnoj diobi, u kontrolnim uzorcima iznosio je 9,43 %, a pri izlaganju cijanidu značajno se smanjivao. Prema navodima autora, smanjenje ispod 50 % uzrokuje subletalne učinke, tj. stanice ostaju žive, ali ne funkcioniraju

ispravno, dok smanjenje ispod 22 % dovodi do letalnih učinaka, odnosno gubitka sposobnosti preživljavanja i daljnjeg dijeljenja [137]. Cijanid tako ometa mitozu i blokira ključne stanične procese, što u konačnici onemogućuje početak ili završetak klijanja.

Utjecaj tiocijanata na rast *Allium cepa*

Tablica 26 prikazuje rezultate utjecaja tiocijanata na rast *Allium cepa*. Za razliku od cijanida i fenola, tiocijanat je pokazao znatno blaži fitotoksični učinak. Klijanje je bilo prisutno u svim posudama, uključujući i one s najvišom koncentracijom tiocijanata (1,00 mmol/L), iako je u tim slučajevima proklijala samo po jedna biljka (16,7 %).

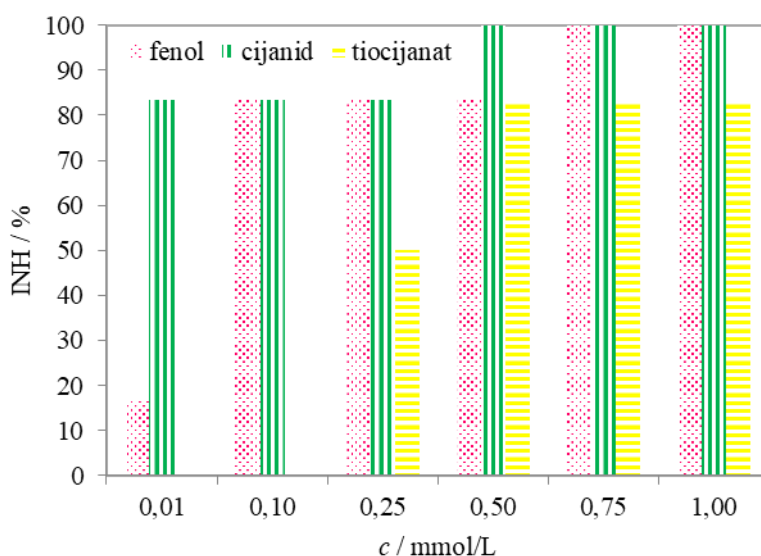
Tablica 26 Rezultati testa fitotoksičnosti tijekom izlaganja *Allium cepa* različitim koncentracijama tiocijanata

dan	7	9	12	21	<i>m</i> (svježa tvar)	<i>m</i> (suha tvar)	% nicanja
tiocijanat	visina izdanka [cm]				[g]	[g]	
0,01 mmol/L	0,0	0,0	9,0	9,5	0,0129	0,0049	100,00
	0,0	0,0	3,0	6,0	0,0153	0,0058	
	0,0	0,0	2,5	5,0	0,0233	0,0088	
	0,0	0,0	3,0	3,5	0,0112	0,0042	
	0,0	0,0	4,5	7,0	0,0161	0,0061	
	0,0	0,0	3,1	6,0	0,0019	0,0007	
0,10 mmol/L	1,5	0,0	0,7	1,0	0,0022	0,0007	100,00
	0,0	0,0	1,0	3,0	0,0170	0,0012	
	0,0	0,0	1,6	3,5	0,0171	0,0102	
	0,0	0,0	2,6	5,0	0,0197	0,0107	
	0,0	0,0	3,4	7,0	0,0247	0,0170	
	0,0	0,0	6,2	8,0	0,0248	0,0188	
0,25 mmol/L	0,5	1,0	1,7	0,7	0,0041	0,0017	50,00
	0,0	0,0	0,5	2,0	0,0099	0,0021	
	0,0	0,0	1,0	4,0	0,0162	0,0024	
0,50 mmol/L	0,0	0,0	0,0	9,0	0,0319	0,0134	16,7
0,75 mmol/L	0,0	0,0	0,0	8,5	0,0272	0,0084	16,7
1,00 mmol/L	0,0	0,0	0,0	7,5	0,0205	0,0068	16,7

Zanimljivo je da su biljke izložene višim koncentracijama tiocijanata (0,50 – 1,00 mmol/L) pokazivale značajnu sposobnost elongacije; visine izdanaka su dosežale do 9,0 cm, što

nadmašuje kontrolnu skupinu. Ova pojava može biti posljedica blagog stimulirajućeg učinka niskog oksidacijskog stresa ili povećane dostupnosti vode. Vidljiva oštećenja bila su jasno izražena. Nekroza, gubitak boje i promjene pigmentacije ukazuju na oštećenje kloroplasta i vaskularnih tkiva. Za razliku od fenola i cijanida, kod tiocijanata je prisutan veći stupanj vidljivih promjena, iako opći fiziološki parametri pokazuju slabiji toksični učinak. Tiocijanati su anionski, topljivi spojevi s niskom reaktivnošću. Iako se lako šire kroz tlo, njihova sposobnost prolaska kroz membrane je ograničena, a biorazgradivost u tlu dodatno smanjuje njihovu trajnost i kumulativni učinak [102,106]. U dostupnoj literaturi nisu pronađene studije koje bi ispitivale učinak tiocijanata na *Allium cepa*, što upućuje na nedovoljno istražen aspekt toksičnosti ove anorganske tvari na biljne sustave.

Radi lakše interpretacije, inhibicija rasta procijenjena je usporedbom broja prokljalih jedinki u uzorku s toksičnom tvari s brojem prokljalih jedinki u kontrolnom uzorku. Na temelju dobivenih vrijednosti inhibicije izrađen je grafički prikaz ovisnosti inhibicije rasta o koncentraciji ispitivanih tvari (**Slika 36**).



Slika 36 Inhibicija rasta *Allium cepa* pri izloženosti različitim koncentracijama fenola, cijanida i tiocijanata

Iz grafikona je jasno da cijanid izaziva potpunu inhibiciju rasta već pri srednjim koncentracijama, dok tiocijanat, unatoč pojavi vidljivih oštećenja, omogućuje visok stupanj preživljavanja i rasta. Fenol pokazuje izrazitu koncentracijsko-ovisnu varijabilnost.

4.1.6. Ukupna analiza toksičnosti

U ovom poglavlju prikazana je usporedna analiza toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata na ispitane testne organizme s obzirom na EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti.

Na temelju eksperimentalnih podataka izrađene su krivulje ovisnosti učinka o dozi, a iz odgovarajućih regresijskih parametara izračunate su EC₅₀ vrijednosti. Budući da u nekim testovima odabrani raspon koncentracija toksičnih tvari nije obuhvaćao EC₅₀ vrijednost, procijenjene su i EC₂₀ vrijednosti. Vrijednosti koje se nalaze izvan primijenjenog raspona koncentracija procijenjene su ekstrapolacijom. Budući da ekstrapolacija uvodi dodatnu nesigurnost u konačni rezultat, sve ekstrapolirane vrijednosti označene su zvjezdicom. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablica 27**.

Tablica 27 Rezultati toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata na testne organizme izraženi kao EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti

tvar	testni organizam	doza-odgovor krivulja			EC ₂₀	EC ₅₀
		presjek	nagib	R ²	[mM / mg/L]	[mM / mg/L]
fenol	<i>Aliivibrio fischeri</i>	0,770	1,746	0,9983	0,1638 / 15,41	0,3621 / 34,08
	<i>Pseudomonas putida</i>	-0,331	0,741	0,9877	0,4314 / 40,60	2,7984 / 263,36*
	<i>Chlorella</i> sp.	-0,300	1,040	0,9919	0,5123 / 48,21	1,9415 / 182,71*
	<i>Lemna minor</i>	-	-	-	-	-
	<i>Allium cepa</i>	1,275	1,000	1,000	0,0133 / 1,25	0,0531 / 5,00
cijanid	<i>Aliivibrio fischeri</i>	1,803	1,079	0,9956	0,0059 / 0,15	0,0214 / 0,56
	<i>Pseudomonas putida</i>	-0,056	0,776	0,9809	0,1982 / 5,16	1,1808 / 30,72
	<i>Chlorella</i> sp.	0,016	0,775	0,9797	0,1593 / 4,14	0,9526 / 24,79
	<i>Lemna minor</i>	0,479	0,473	0,9234	0,0052 / 0,14*	0,0972 / 2,53
	<i>Allium cepa</i>	-	-	-	< 0,0384 / < 1,0	< 0,0384 / < 1,0
tiocijanat	<i>Aliivibrio fischeri</i>	0,221	1,045	0,9928	0,1632 / 9,48	0,6150 / 35,72
	<i>Pseudomonas putida</i>	-0,658	1,036	0,9441	1,1315 / 65,72	4,311 / 250,39*
	<i>Chlorella</i> sp.	-0,376	1,301	0,9909	0,6705 / 38,94	1,9458 / 113,01
	<i>Lemna minor</i>	-0,641	0,710	0,9386	1,1338 / 65,85	7,9801 / 463,48
	<i>Allium cepa</i>	0,451	1,265	0,9456	0,1470 / 8,54	0,4379 / 25,54

Usporedba EC vrijednosti pokazuje da je cijanid najtoksičniji od tri ispitivana spoja za sve testirane organizme, dok se fenol i tiocijanat izmjenjuju na drugom i trećem mjestu, ovisno o organizmu.

EC₅₀ vrijednost fenola za *Aliivibrio fischeri* (0,3621 mmol/L = 34,0 mg/L) u skladu je s podacima iz literature. Ghosh i Doctor [41] izmjerili su EC₅₀ od 26,01 mg/L nakon 30 minuta izloženosti, dok su Marugán i sur. [40] zabilježili vrijednosti od 27 mg/L kod primjene komercijalnog kita, odnosno 49,3 mg/L pri primjeni bakterijske kulture. Nasuprot tome, vrlo visoka ekstrapolirana EC₅₀ vrijednost fenola za *Pseudomonas putida* (2,7984 mmol/L = 263,36 mg/L) ukazuje na otpornost ove bakterije na fenol, budući da čak i najviša primijenjena koncentracija nije izazvala inhibiciju rasta kod 50 % populacije.

Mikroalga *Chlorella* sp. pokazala je nešto veću osjetljivost na fenol u odnosu na *Pseudomonas putida*, što potvrđuje također ekstrapolirana, ali niža EC₅₀ vrijednost (1,9415 mmol/L = 182,71 mg/L). Ovi rezultati u skladu su s literaturnim podacima. Duan i sur. [19] proveli su sveobuhvatan pregled literature o toksičnosti fenola kod različitih vodenih organizama, zaključivši da fenol ne utječe negativno na rast bakterija, dok je za alge blago toksičan. Za razliku od *Pseudomonas putida*, EC₅₀ vrijednosti fenola za morske i slatkovodne alge zabilježene su u literaturi. Duan i sur. [25] istaknuli su veću osjetljivost morskih algi, poput *Dunaliella salina*, *Platymonas subcordiformis*, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin i *Skeletonema costatum*, u usporedbi sa slatkovodnim vrstama. Za morske alge zabilježene su niže EC₅₀ vrijednosti (27,32 – 92,97 mg/L), dok su za slatkovodne vrste izmjerene više vrijednosti (126,85 – 370 mg/L). Naši rezultati sukladni su s EC₅₀ vrijednostima za slatkovodne alge, kojima pripada i *Chlorella* sp.. Relativna konzistentnost rezultata toksičnosti dobivenih testovima sa *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp. sugerira da su ti testovi podjednako osjetljivi na ispitivane tvari, unatoč tome što uključuju dvije različite skupine organizama. Važno je napomenuti da obje kulture imaju sposobnost sinteze enzima koji omogućuju razgradnju fenola, što ukazuje na potencijalnu mogućnost korištenja fenola kao izvora ugljika i energije [106, 125].

Iako literaturni podaci ukazuju na osjetljivost vrsta poput *Lemna minor*, *Lemna obscura* i *Lemna gibba* na fenolne spojeve [36], u ovom istraživanju nije zabilježena inhibicija rasta listića vrste *Lemna minor* pri koncentracijama fenola nižim od 1 mmol/L (100 mg/L). Naprotiv, s porastom koncentracije fenola zabilježen je izražen poticaj rasta, što sugerira mogućnost da *Lemna minor* metabolizira fenol. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Songa i Huanga [140], koji nisu uočili negativan učinak na rast *Lemna polyrhiza* nakon osmodnevne izloženosti pentaklorofenolu u koncentraciji od 1,88 mmol/L.

Allium cepa pokazao je iznenađujuće nisku EC₅₀ vrijednost za fenol (0,0531 mmol/L = 5,00 mg/L) ako se uzme u obzir samo jedno dostupno izvješće u literaturi, u kojemu je navedena IC₅₀ vrijednost fenola za *Allium cepa* od 229,02 mg/L nakon petodnevne izloženosti [141].

Što se tiče izloženosti cijanidu, *Aliivibrio fischeri* se pokazao kao najosjetljiviji organizam s najnižom EC₅₀ vrijednošću (0,0214 mmol/L = 0,56 mg/L). Iako su testovi s ovom bioluminiscentnom bakterijom popularni zbog visoke osjetljivosti i jednostavne izvedbe, u literaturi je pronađena samo jedna studija koja navodi EC₅₀ vrijednost za cijanid [40] gdje je zabilježena vrijednost od 1,9 mg/L, što je četiri puta viša vrijednost od naše, ali i dalje ukazuje na visoku osjetljivost ove vrste na cijanid.

Cijanid nije pokazao značajnu toksičnost prema *Pseudomonas putida* (1,1808 mmol/L = 30,72 mg/L) niti prema *Chlorella* sp. (0,9526 mmol/L = 24,79 mg/L). Neki autori smatraju da obje vrste mogu iskorištavati cijanid [106]. Kod mikroalgi je granica između toksičnog i stimulativnog učinka često nejasna. Liu i sur. [70] ispitivali su učinak KCN na zelenu algu *Chlorella vulgaris* i utvrdili da niska koncentracija (0,1 mg/L) potiče rast i sintezu klorofila, vjerojatno zbog brze razgradnje cijanida u netoksične nusprodukte koji mogu poslužiti kao izvor ugljika. Međutim, pri višim koncentracijama zabilježena je značajna inhibicija rasta, a EC₅₀ vrijednost iznosila je svega $5,59 \times 10^{-5}$ mg/L. Takva razina toksičnosti je iznenađujuća, osobito s obzirom na sposobnost *Chlorella* sp. da iskorištava cijanid, kao i pozitivne učinke niskih koncentracija zabilježene od strane istih autora.

EC₅₀ vrijednosti cijanida za *Lemna minor* (0,0972 mmol/L = 22,53 mg/L) i *Allium cepa* (< 0,0384 mmol/L = < 1,00 mg/L) vrlo su niske, što ih svrstava među tri najosjetljivija organizma na cijanid, zajedno s *Aliivibrio fischeri*. Međutim, nisu pronađeni prikladni literaturni podaci za usporedbu. Jedino izvješće o toksičnosti cijanida na *Allium cepa* opisuje različite toksične učinke, ali ne navodi točnu vrijednost toksičnosti [142].

Što se tiče tiocijanata, njegova najniža EC₅₀ vrijednost gotovo je jednaka najvišoj zabilježenoj vrijednosti za cijanid. Na *Aliivibrio fischeri* tiocijanat djeluje slično kao fenol (0,6150 mmol/L = 35,72 mg/L), dok je za *Allium cepa* bio znatno toksičniji (0,4397 mmol/L = 25,54 mg/L). Slijede *Chlorella* sp. (1,9458 mmol/L = 113,01 mg/L), *Pseudomonas putida* (4,3111 mmol/L = 250,39 mg/L) i, kao najmanje osjetljiva, *Lemna minor* (7,9801 mmol/L = 463,48 mg/L). Ekstrapolirane EC₅₀ vrijednosti upućuju na to da su primijenjene koncentracije tiocijanata u pojedinim testovima bile preniske za potpuniju procjenu toksičnosti.

Sveukupna usporedba toksičnosti ispitivanih spojeva prema pet testnih organizama pokazuje da je cijanid bio najtoksičniji spoj, a *Aliivibrio fischeri* najosjetljiviji organizam. Promatrajući

vertikalno unutar svakog organizma, cijanid je redovito pokazivao najniže EC₅₀ vrijednosti, što ukazuje na njegovu visoku učinkovitost u izazivanju toksičnih učinaka. Horizontalno, između organizama za pojedini spoj, može se zaključiti da su bakterije, osobito *Aliivibrio fischeri*, bile općenito osjetljivije na sve ispitivane tvari u usporedbi s algama i višim biljkama. S druge strane, *Allium cepa* je iznenadila izrazitom osjetljivošću na fenol i cijanid, dok je *Lemna minor* pokazala otpornost, osobito prema tiocijanatu. Ovakva razina diferencijalne osjetljivosti među organizmima naglašava važnost korištenja više trofičkih razina u ekotoksikološkim ispitivanjima kako bi se dobila cjelovita slika utjecaja pojedinih onečišćujućih tvari na okoliš.

4.1.7. Toksičnost smjese fenola, cijanida i tiocijanata

Budući da u okolišu može postojati velik broj kombinacija toksičnih tvari, procjena rizika za vodene smjese najčešće se temelji na eksperimentalnim podacima i matematičkim modelima. Ovi modeli omogućuju predviđanje ukupne toksičnosti smjese na temelju poznatog sastava i toksičnosti pojedinih komponenti. Najčešće je model koncentracijske adicije, opisan u poglavlju 2.9. Međutim, kemijske smjese, osobito vodene, općenito pokazuju vrlo složeno ponašanje, koje često dovodi do izraženijih (sinergizam) ili slabijih (antagonizam) toksičnih učinaka od očekivanih, odnosno onih procijenjenih modelom (6,131). Stoga su svi dodatni podaci o mogućim sinergističkim i antagonističkim odstupanjima od očekivanog ponašanja iznimno važni za odgovarajuću procjenu rizika. U ovom poglavlju prikazani su rezultati analize zajedničkog toksičnog djelovanja fenola, cijanida i tiocijanata u vodenim otopinama. Eksperimentalni podaci o toksičnosti dobiveni su primjenom testa toksičnosti s *Aliivibrio fischeri*. **Tablica 28** sadrži rezultate testa toksičnosti. Podaci prikazuju parametre lineariziranih krivulja doza-odgovor i pripadajuće EC₅₀ vrijednosti.

Tablica 28 Rezultati testa toksičnosti s *Aliivibrio fischeri* za binarne i ternarne smjese fenola, cijanida i tiocijanata

Kombinacija	Omjer smjese	Presjek	Nagib	R^2	EC_{50}/mM
Fenol i cijanid	25:75	1,579	1,259	0,9953	0,0557
	50:50	1,676	1,145	0,9938	0,0344
	75:25	1,742	1,117	0,9972	0,0275
Fenol i tiocijanat	25:75	0,745	1,376	0,9955	0,2875
	50:50	0,602	1,213	0,9973	0,3188
	75:25	0,453	1,176	0,9947	0,4120
Cijanid i tiocijanat	25:75	1,744	1,132	0,9975	0,0288
	50:50	1,481	1,059	0,9971	0,0400
	75:25	1,189	1,040	0,9953	0,0719
Fenol i cijanid i tiocijanat	25:25:50	1,972	1,763	0,9967	0,0619
	25:50:25	2,173	1,521	0,9935	0,0151
	50:25:25	1,963	1,621	0,9963	0,0250
	33,3:33,3:33,3	1,811	1,330	0,9972	0,0236

Matematičko modeliranje

Koncentracije i eksperimentalno određene vrijednosti toksičnosti binarnih i ternarnih smjesa fenola, cijanida i tiocijanata (**Tablica 28**) ugrađene su u aditivni model, tj. u jednadžbu aditivne izobole (37):

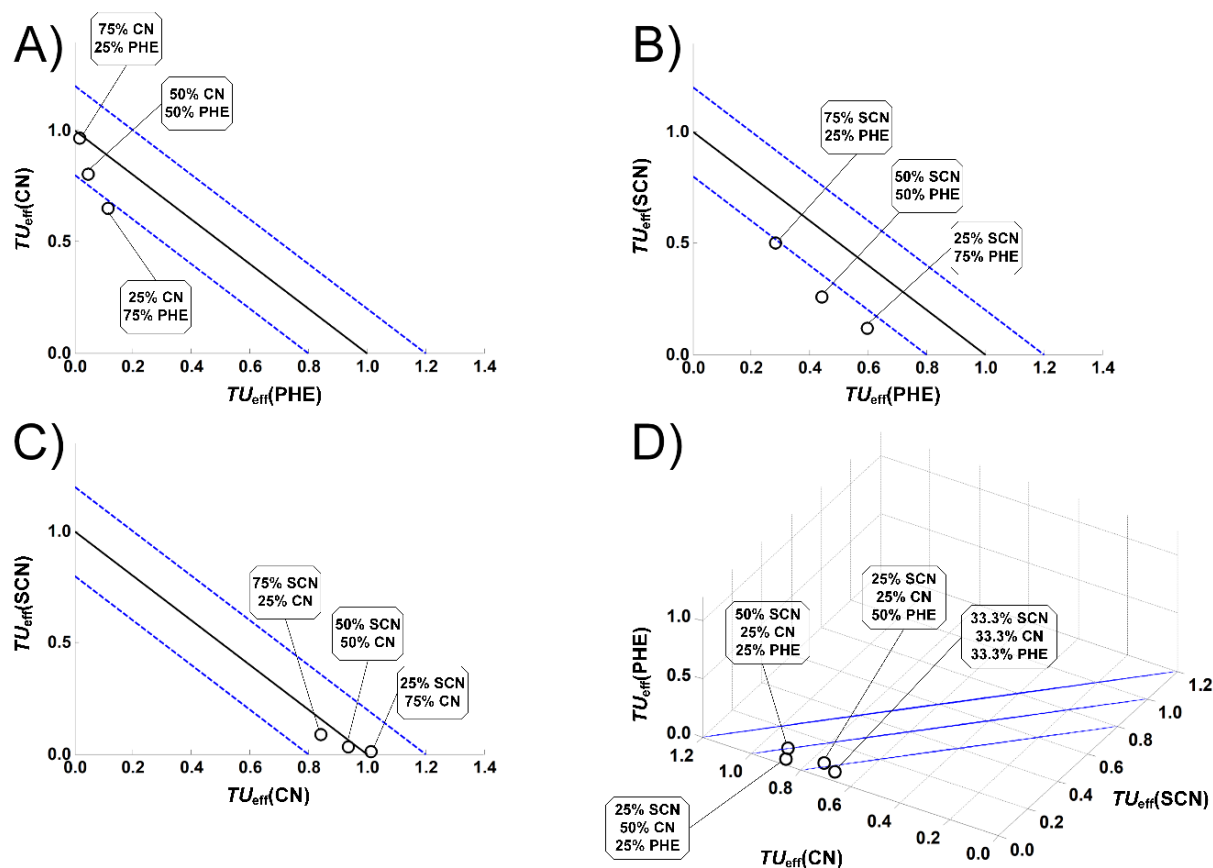
$$\sum_i TU_i = \sum_i \frac{c_i}{EC_{50,i}} = 1 \quad (37)$$

gdje je

- c_i koncentracije komponente i u smjesi [mmol/L],
- $EC_{50,i}$ koncentracija komponente koja uzrokuje biološki odgovor kod 50 % populacije,

– TU_i toksikološki učinak komponente i .

Konstruirani su izobologrami binarnih i ternarnih smjesa (**Slika 37**). Izobola (engl. *isobole*) je grafički prikaz kombiniranog učinka dviju ili više toksičnih tvari. Na osima x i y nalaze se koncentracije pojedinih komponenata smjese koje u određenoj kombinaciji uzrokuju isti biološki učinak, najčešće izražen kao EC_x vrijednost. Svaka točka na izoboli predstavlja specifičnu kombinaciju koncentracija toksičnih tvari koja dovodi do ciljanog efekta. Takav prikaz omogućuje vizualnu procjenu interakcija među komponentama smjese. U ekotoksikologiji se najčešće koristi aditivna izobola, koja predstavlja očekivano ponašanje smjese u slučaju da sve komponente djeluju aditivno, tj. bez međusobne interakcije. Aditivna izobola je u pravilu linearna i spaja točke na kojima bi svaka od komponenti samostalno izazvala ciljani učinak. Primjerice, za EC_{50} učinak, ta linija spaja točke (EC_{50} komponenta 1, 0) i (0, EC_{50} komponenta 2) na dvodimenzionalnom grafu. Ukoliko se eksperimentalne točke nalaze ispod aditivne izobole (konkavna zakrivljenost prema dolje), to upućuje na sinergistički učinak, tj. kombinacija tvari izaziva jači učinak nego što bi se očekivalo na temelju njihovih pojedinačnih toksičnosti. Suprotno tome, ako se točke nalaze iznad aditivne izobole (konkavna zakrivljenost prema gore), to upućuje na antagonistički učinak, odnosno oslabljeno djelovanje u smjesi u odnosu na očekivani aditivni odgovor [10].



Slika 37 Izobologrami binarnih (A, B, C) i ternarnih (D) smjesa fenola, cijanida i tiocijanata

Aditivna izobola koja spaja točke (0, 1) i (1, 0) za binarne smjese prikazuje ponašanje prema aditivnom modelu, odnosno funkciju opisanu jednadžbom (36).

U slučaju ternarnih smjesa, model aditivnog ponašanja predstavljen je ravninom koja povezuje točke (0,0,1), (0,1,0) i (1,0,0). Kako bi se bolje vizualiziralo pozicioniranje točaka, kut prikaza za slučaj D postavljen je tako da su ravnine vidljive samo u presjeku, odnosno kao linije. S obzirom na to da je određivanje toksičnosti podložno slučajnim pogreškama, odabran je interval predviđanja od $\pm 20\%$ (područje omeđeno izobolama 0,8 i 1,2) kako bi se povećala pouzdanost donesenih zaključaka.

Za smjesu fenola i cijanida može se uočiti da na položaj TU točaka značajno utječe dominantna toksičnost cijanida, budući da su relativno blizu osi cijanida (u ovom slučaju to je ordinata). Sve tri TU točke nalaze se ispod aditivne izobole, no točke koje se odnose na smjese u kojima cijanid čini 50 i 75 % ukupne koncentracije toksičnih tvari nalaze se unutar predviđenog intervala 0,8 – 1,2. Međutim, promatrajući položaj TU točke smjese s 25 % cijanida, koja se nalazi ispod izobole 0,8, jasno je vidljivo da postoji trend prema kojem bi TU točke nastavile izlaziti iz intervala 0,8 – 1,2 kako se sadržaj fenola dodatno povećava. To ukazuje na

sinergističko djelovanje ove dvije toksične tvari, koje je djelomično prikriveno dominantnom toksičnošću cijanida.

Sinergističko djelovanje primjećuje se i kod kombinacije fenola i tiocijanata, ali je u ovom slučaju situacija mnogo izraženija. Zbog slične toksičnosti fenola i tiocijanata, ne dolazi do pozicioniranja *TU* točaka u blizini apscise ili ordinate te su sve tri smjese rezultirale *TU* točkama ispod izobole 0,8.

Kod otopina u kojima su kombinirani cijanid i tiocijanat, dominantna toksičnost cijanida ponovno je dovela do pozicioniranja *TU* točaka relativno blizu osi cijanida (u ovom slučaju to je apscisa). Međutim, nije uočen nikakav odmak od aditivnosti, budući da su sve tri točke unutar odabranog predviđenog intervala. Štoviše, nalaze se u neposrednoj blizini aditivne izobole. Nedostatak odstupanja od aditivnosti upućuje na potencijalno slične mehanizme toksičnog djelovanja ovih dviju tvari.

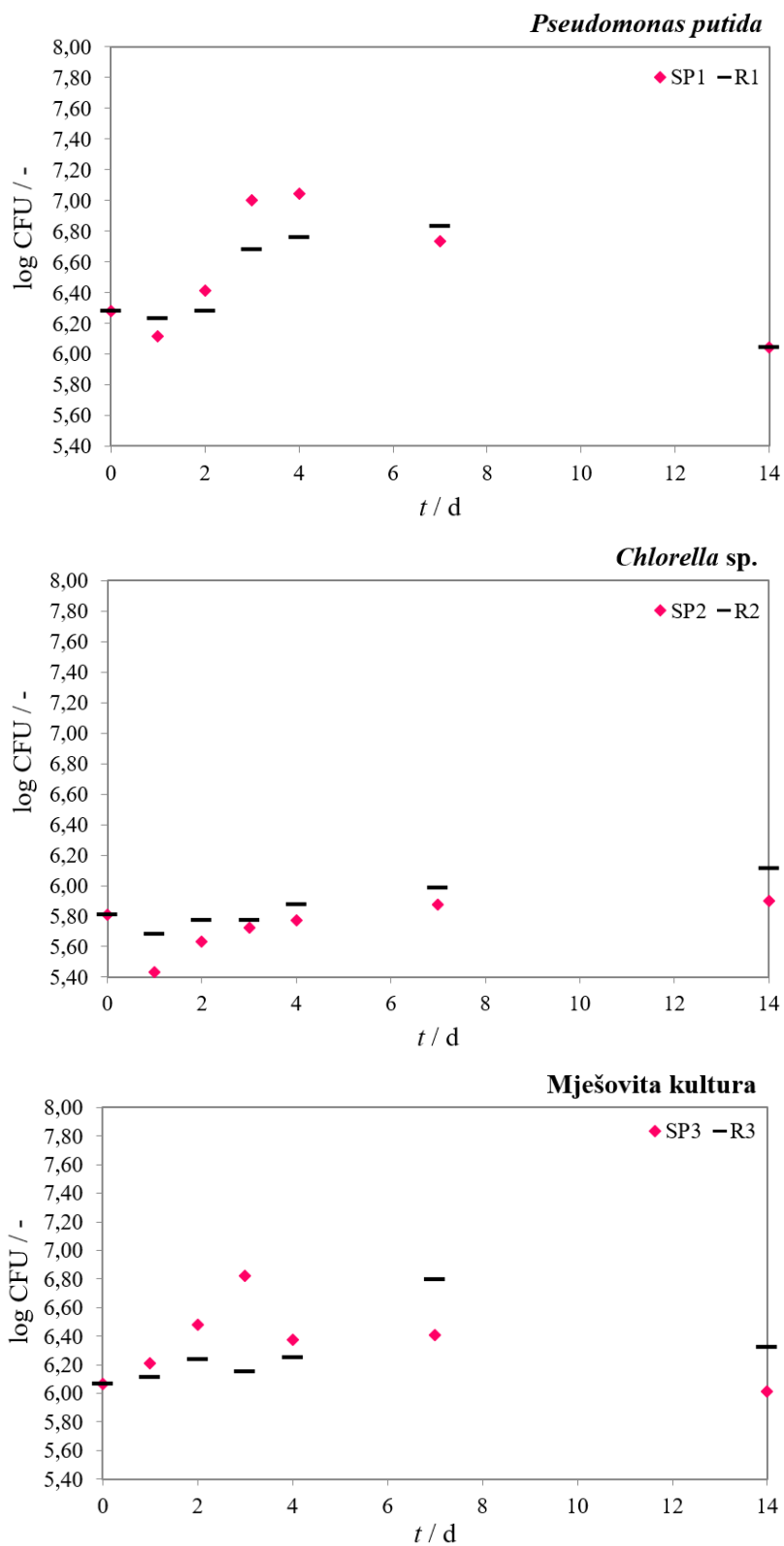
Analiza ponašanja ternarnih smjesa nije pokazala dodatno pojačanje sinergizma. Tendencija pozicioniranja *TU* točaka bila je više-manje ista kao i kod binarnih smjesa. Ponovno je vidljiv dominantni utjecaj toksičnosti cijanida u odnosu na fenol i tiocijanat, što se očituje u pozicioniranju *TU* točaka blizu osi cijanida. Sve četiri smjese rezultirale su *TU* točkama ispod ravnine aditivnosti. *TU* točke smjesa s nižim sadržajem fenola (25 %) bliže su ravnini aditivnosti, dok su točke koje odgovaraju nešto višim sadržajima fenola (33,3 i 50 %) u neposrednoj blizini izobolne ravnine 0,8: jedna točka unutar, a jedna izvan predviđenog intervala. Ovo ponovno ukazuje na sinergističko djelovanje u otopinama koje sadrže fenol, koje je pri nižim sadržajima fenola djelomično prikriveno, najvjerojatnije zbog dominantne toksičnosti cijanida.

4.2. Biorazgradnja smjese

Općenito, industrijski otpadni tokovi sadrže smjesu onečišćujućih tvari, što otežava njihovu biološku obradu jer svaka komponenta zahtjeva različite procesne uvjete. Nadalje, biološka obrada monosupstrata može biti inhibirana prisutnošću dodatnog supstrata u otpadnoj vodi. Interakcija više supstrata zahtjevnija je zbog njihove međusobne kompeticije za bakterijske enzime, ali i toksičnosti. Kada se mikroorganizmi uzgajaju na dva kompatibilna supstrata, primjerice na dva izvora ugljika, skloni su najprije iscrpiti onaj koji omogućuje najveću brzinu rasta. To je u skladu s istraživanjem Singh i Balomajumder [11], u kojem mikroorganizam najprije iskorištava glukozu, a potom fenol i cijanid. Naime, biorazgradnja otopine koja sadrži mješavinu supstrata složenija je i sporija, a u nekim slučajevima i neučinkovita, u usporedbi s razgradnjom pojedinačnih spojeva [93].

4.2.1. Rezultati prvog preliminarnog pokusa

U sklopu preliminarnih pokusa određena je CFU vrijednost za tri eksperimentalne varijante, s bakterijom *Pseudomonas putida* (R1), mikroalgom *Chlorella* sp (R2) te njihovom mješovitom kulturom (R3), s ciljem procjene njihove sposobnosti biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 1 mmol/L. **Slika 38** prikazuje tijek promjene CFU vrijednosti tijekom 14 dana pokusa za sve tri eksperimentalne varijante.



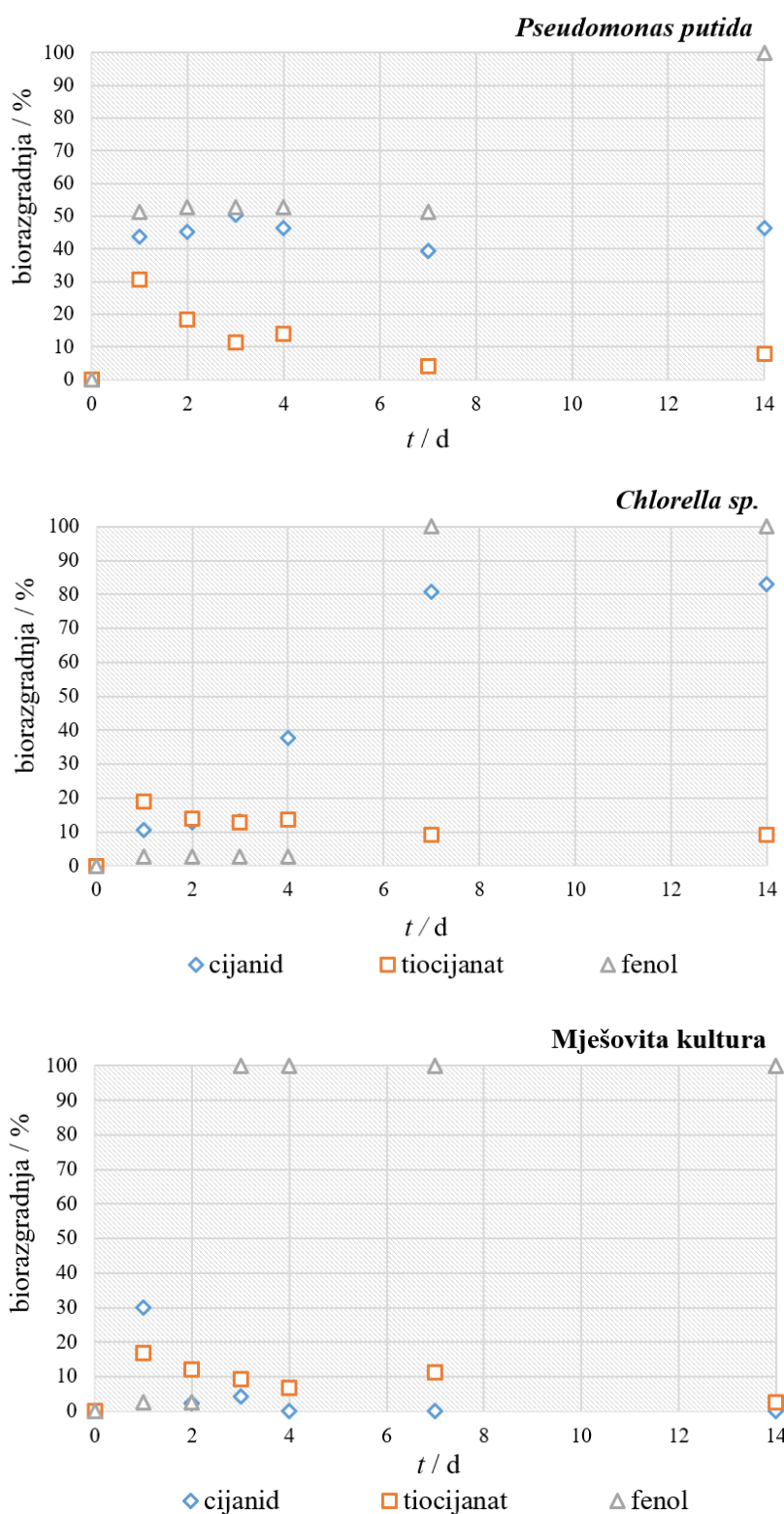
Slika 38 Promjena logaritamske CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. i njihove mješovite kulture tijekom 14 dana izloženosti smjesi fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 1 mmol/L

U reaktorskoj jedinici koja je sadržavala bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* (R1) zabilježena je početna stagnacija broja kolonija tijekom prva dva dana, nakon čega slijedi izražen porast broja kolonija do šestog dana, a zatim pad broja kolonija do kraja pokusa. Početna CFU vrijednost iznosila je $1,9 \times 10^6$ CFU/mL, dok je nakon 14 dana iznosila $1,1 \times 10^6$ CFU/mL. Ovi rezultati ukazuju na prisutnost svih tipičnih faza bakterijskog rasta, od prilagodbe, eksponencijalnog rasta, stacionarne do faze odumiranja. U usporedbi s kontrolom (SP1), nije zabilježen porast broja kolonija, što upućuje na ograničenu sposobnost bakterije da smjesu ispitivanih tvari upotrijebi kao izvor ugljika i energije.

U reaktorskoj jedinici s mikroalgom *Chlorella* sp. (R2), CFU vrijednosti su tijekom trajanja pokusa pokazivale stabilan i postupan rast, uz dosljedno više vrijednosti u prisutnosti smjese fenola, cijanida i tiocijanata u odnosu na odgovarajuću kontrolu (SP2). Početna CFU vrijednost bila je $6,4 \times 10^5$ CFU/mL, a na kraju pokusa dostigla je vrijednost od $1,3 \times 10^6$ CFU/mL, što ukazuje na uspješnu prilagodbu mikroalge i njenu potencijalnu sposobnost biorazgradnje prisutnih toksičnih spojeva.

U reaktorskoj jedinici s mješovitom kulturom (R3), dinamika promjene CFU vrijednosti bila je nestabilna. Nakon početnog rasta do sedmog dana, broj kolonija se smanjivao prema kraju pokusa. Zanimljivo je da su cijelo vrijeme trajanja pokusa CFU vrijednosti bile niže u prisutnosti smjese fenola, cijanida i tiocijanata, nego u kontrolnom uzorku (SP3). Početna CFU vrijednost iznosila je $1,2 \times 10^6$ CFU/mL, a krajnja $2,1 \times 10^6$ CFU/mL. Ovi rezultati upućuju na moguć negativan međusobni utjecaj mikroorganizama ili na inhibicijski učinak toksične smjese, koji se izraženije očitovao u prisustvu obje kulture. Monteiro i sur. [143] također su opazili da je maksimalna specifična stopa rasta *Pseudomonas putida* bila viša nego u ona mješovitih kultura u pokusima biorazgradnje fenola.

Uz kvantifikaciju broja kolonija, tijekom prvog preliminarnog pokusa praćene su i promjene koncentracija fenola, cijanida i tiocijanata tijekom vremena kako bi se procijenio stupanj njihove biorazgradnje primjenom odabranih mikroorganizama. **Slika 39** prikazuje učinkovitost biorazgradnje (%) smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 1 mmol/L primjenom bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. i njihove mješovite kulture tijekom 14 dana.



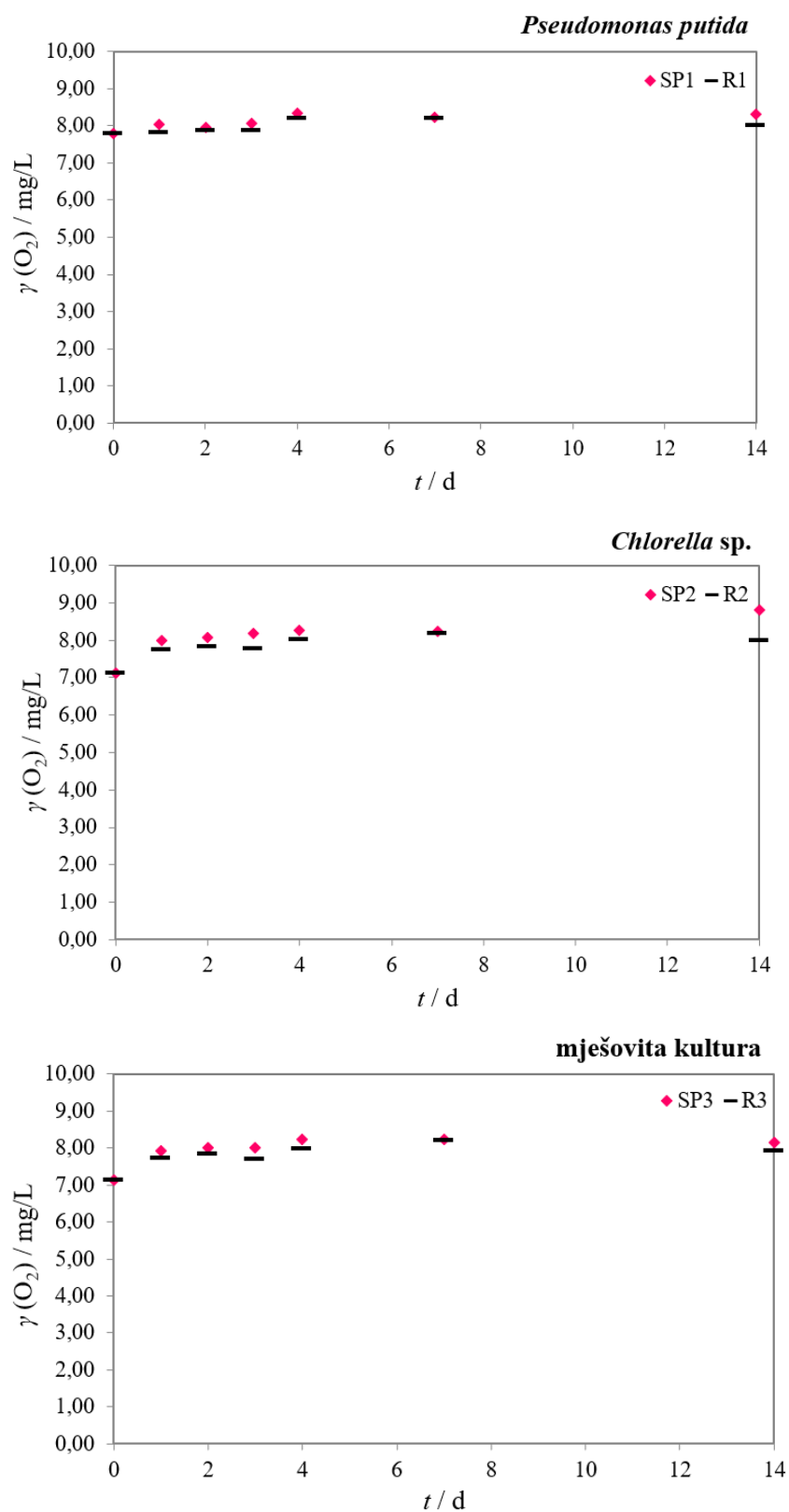
Slika 39 Učinkovitost biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata bakterijom *Pseudomonas putida*, mikroalgom *Chlorella sp.* i njihovom mješovitom kulturom tijekom prvog preliminarnog pokusa

U svim eksperimentalnim varijantama fenol je u potpunosti uklonjen iz otopine što ukazuje na visoku biorazgradivost ovog spoja u danim uvjetima. Međutim, izostanak značajnijeg porasta

broja kolonija tijekom pokusa sa *Pseudomonas putida* sugerira da uklanjanje fenola nije nužno bilo praćeno proporcionalnim mikrobnim umnažanjem, što upućuje na moguću metaboličku aktivnost bez stanične diobe ili na pojavu stresnog odgovora bakterije. Jedno od mogućih objašnjenja jest da su stanice *Pseudomonas putida* u uvjetima prisutnosti toksične smjese djelomično prešle u metabolizam održavanja, u kojem se energija koristi za preživljavanje i detoksikaciju, a ne za rast. Također, treba uzeti u obzir da su uz fenol u otopini bile prisutne i druge toksične komponente koje mogu imati inhibicijski učinak na ključne enzime uključene u razgradnju fenola, kao što su fenol hidroksilaza i druge oksigenaze, čiji je rad ovisan o metalnim kofaktorima. Cijanid, kao poznati inhibitor metalnih enzima, može narušiti oksidativne puteve, dok tiocijanat može poremetiti ionsku ravnotežu i izazvati dodatni fiziološki stres. Moguće je da je fenol, iako razgrađen, djelomično metaboliziran alternativnim putevima bez popratne biomase, pri čemu se energija usmjerava na detoksikaciju, a ne na biosintezu. Ova pojava, iako kontradiktorna na prvi pogled, zabilježena je i u drugim istraživanjima u kojima je razgradnja fenola bila učinkovita, ali nije bila praćena očekivanim porastom broja stanica zbog prisutnosti dodatnih stresora u sustavu [84, 89]. Stoga se može pretpostaviti da je učinkovitost razgradnje fenola u ovom slučaju rezultat visoke metaboličke fleksibilnosti bakterije *Pseudomonas putida*, ali i da je ukupna fiziološka aktivnost bila modulirana kombiniranim toksičnim učinkom smjese, što je ograničilo rast i održavanje stabilne populacije. Ovi nalazi ukazuju na važnost istovremene interpretacije kvantitativnih i kvalitativnih parametara biorazgradnje jer sama razgradnja ne znači nužno optimalne uvjete za rast mikroorganizama, osobito u složenim, višekomponentnim sustavima.

Kada je riječ o cijanidu, bakterijska kultura *Pseudomonas putida* razgradila je približno 46 %, dok je mikroalga *Chlorella* sp. pokazala znatno višu sposobnost biorazgradnje od 83 %. Nasuprot tome, tiocijanati su se pokazali izrazito postojanima. Kod obje monokulture zabilježena je učinkovitost biorazgradnje ispod 10 %. Još slabiji rezultati dobiveni su za mješovitu kulturu, kod koje su učinkovitosti biorazgradnje cijanida i tiocijanata ispod 5 %, što ukazuje na nedostatak sinergijskog djelovanja ili čak kompetitivne inhibicije unutar zajednice mikroorganizama.

Budući da su primijenjeni mikroorganizmi striktno aerobni, biorazgradnja ispitivanih tvari prirodno je povezana s potrošnjom kisika, zbog čega je praćenje koncentracije otopljenog kisika tijekom pokusa važno za neizravnu procjenu intenziteta biorazgradnje. **Slika 40** prikazuje promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe prvog preliminarnog pokusa.



Slika 40 Promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe prvog preliminarnog pokusa

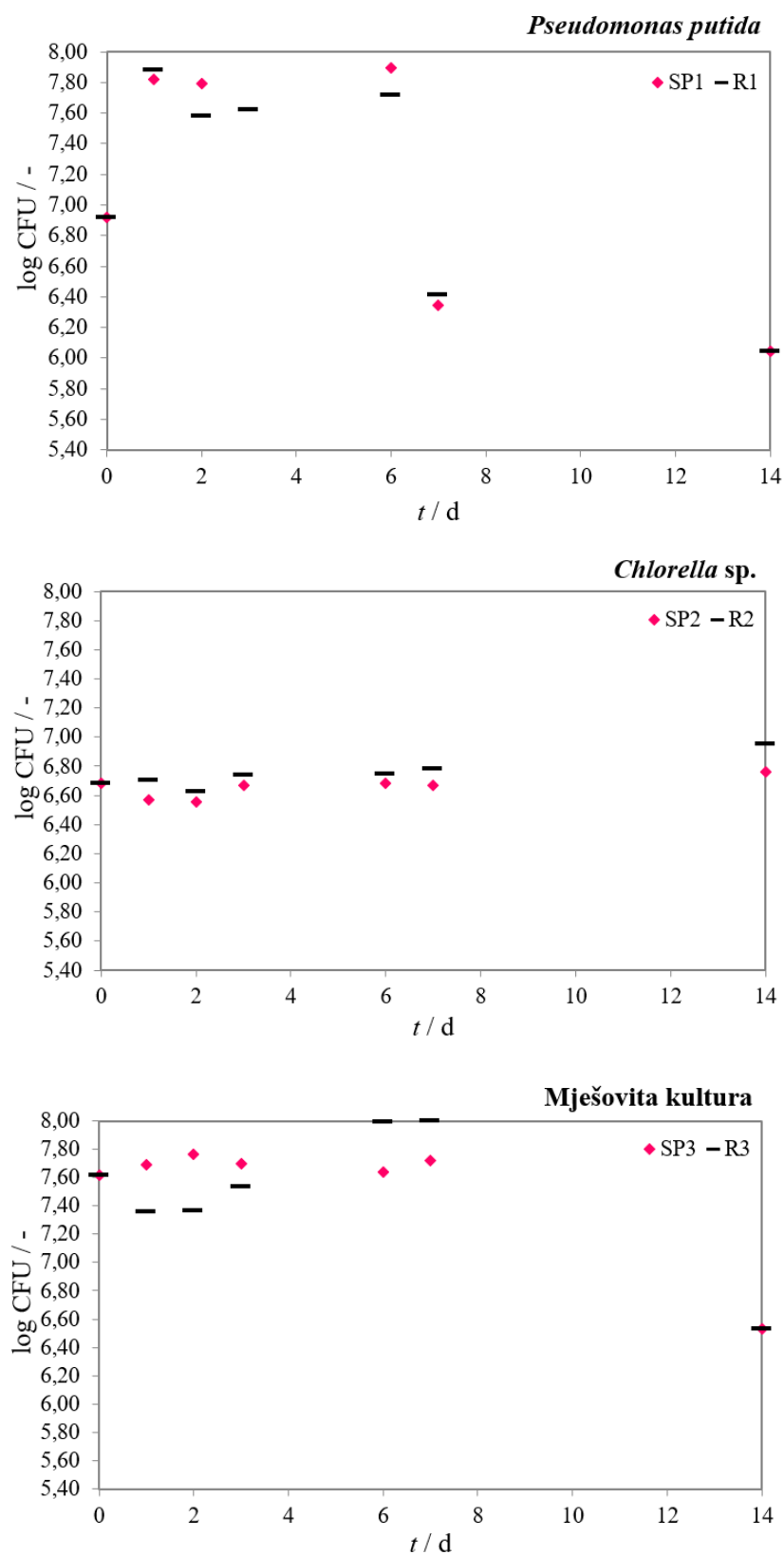
U reaktorskoj jedinici s bakterijom *Pseudomonas putida* (R1), koncentracija otopljenog kisika ostala je gotovo nepromijenjena tijekom prva tri dana, nakon čega je zabilježen blagi porast. Usporedbom s kontrolom (SP1) vidljivo je da su koncentracije kisika u prisutnosti smjese fenola, cijanida i tiocijanata tek neznatno niže unutar prva četiri dana, što upućuje na ograničenu aktivnost bakterija u početnoj fazi pokusa i relativno slab intenzitet biorazgradnje.

S druge strane, u reaktorskoj jedinici s mikroalgom *Chlorella* sp. (R2) zabilježena je izraženija razlika u koncentraciji otopljenog kisika u odnosu na kontrolni uzorak (SP2). Pad koncentracije kisika dodatno potvrđuje već ranije utvrđenu visoku učinkovitost mikroalge u razgradnji fenola i cijanida, jer intenzivniji metabolizam rezultira većom potrošnjom kisika.

U reaktorskoj jedinici s mješovitom kulturom (R3), u većem dijelu pokusa bile su slične kontrolnim vrijednostima (SP3). To sugerira da nije došlo do značajne biorazgradnje smjese, što je u skladu s prethodnim rezultatima CFU vrijednosti i učinkovitosti biorazgradnje.

4.2.2. Rezultati drugog preliminarnog pokusa

U drugom preliminarnom pokusu početna koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata smanjena je na 0,1 mmol/L kao posljedica slabe učinkovitosti biorazgradnje u prvom preliminarnom pokusu. U sklopu preliminarnih pokusa određena je CFU vrijednost za tri eksperimentalne varijante, s bakterijom *Pseudomonas putida* (R1), mikroalgom *Chlorella* sp (R2) te njihovom mješovitom kulturom (R3), s ciljem procjene njihove sposobnosti biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 0,1 mmol/L. **Slika 41** prikazuje tijek promjene CFU vrijednosti tijekom 14 dana pokusa za sve tri eksperimentalne varijante.



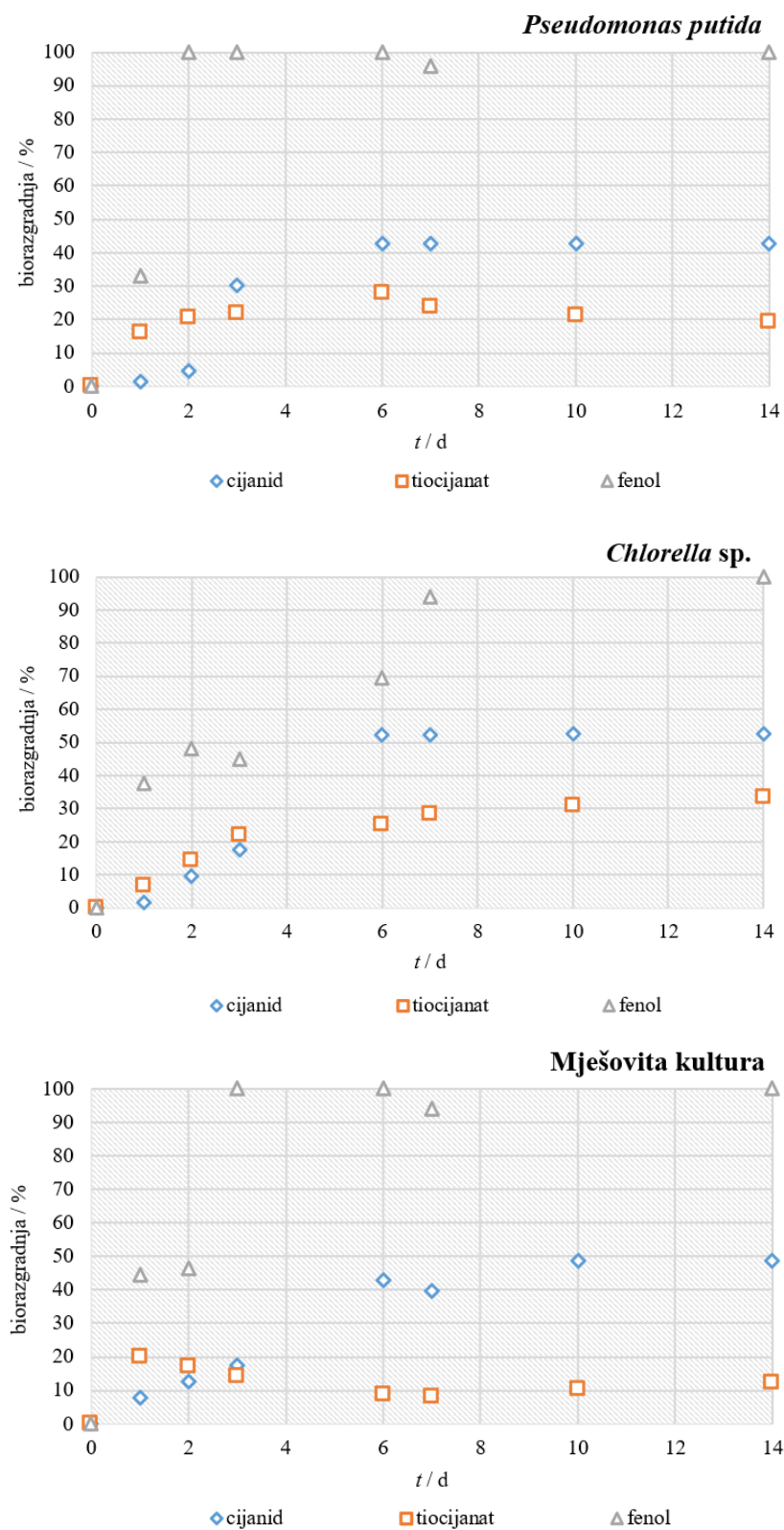
Slika 41 Promjena logaritamske CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella sp.* i njihove mješovite kulture tijekom 14 dana izloženosti smjesi fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 0,1 mmol/L

U reaktorskoj jedinici s bakterijom *Pseudomonas putida* (R1) nije zabilježena faza prilagodbe već je rast bakterije započeo eksponencijalno. Ovakav uzorak rasta u skladu je s literaturnim podacima koji upućuju na inhibicijski učinak toksičnih tvari na rast *Pseudomonas putida* pri višim koncentracijama, o kojima ovisi i trajanje faze prilagodbe [143]. U prvom preliminarnom pokusu, u kojemu je koncentracija smjese bila viša, primijećena je i duža faza prilagodbe mikroorganizma. Početna CFU vrijednost iznosila je $8,3 \times 10^6$ CFU/mL, a do kraja pokusa pala je na $1,1 \times 10^6$ CFU/mL. Kao i u prvom preliminarnom pokusu, CFU vrijednosti u reaktorskoj jedinici R1 nisu premašile one u kontroli SP1, što znači da bakterija ne koristi smjesu kao izvor ugljika i energije.

Suprotno tome, u reaktorskoj jedinici s mikroalgom *Chlorella* sp. (R2) zabilježen je stabilan rast broja kolonija, uz konzistentno više CFU vrijednosti u odnosu na kontrolu (SP2), što upućuje na učinkovitu biorazgradnju smjese. Početna CFU vrijednost iznosila je $4,8 \times 10^6$ CFU/mL, dok je nakon 14 dana narasla na $8,9 \times 10^6$ CFU/mL.

U reaktorskoj jedinici s mješovitom kulturom (R3) uočen je dinamičan obrazac. Nakon početnog smanjenja CFU vrijednosti uslijedio je kratkotrajan porast broja kolonija, te ponovni pad nakon sedmog dana. CFU vrijednost na početku pokusa iznosila je $4,1 \times 10^7$ CFU/mL, dok je po završetku pokusa iznosila $1,1 \times 10^6$ CFU/mL. U pojedinim vremenskim točkama CFU vrijednosti bile su više u kontroli (SP3) nego u prisutnosti fenola, cijanida i tiocijanata.

Uz kvantifikaciju broja kolonija, tijekom drugog preliminarnog pokusa praćene su i promjene koncentracija fenola, cijanida i tiocijanata kako bi se procijenio stupanj njihove biorazgradnje primjenom odabranih mikroorganizama. **Slika 42** prikazuje učinkovitost biorazgradnje (%) smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracije 1 mmol/L primjenom bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. i njihove mješovite kulture tijekom 14 dana.

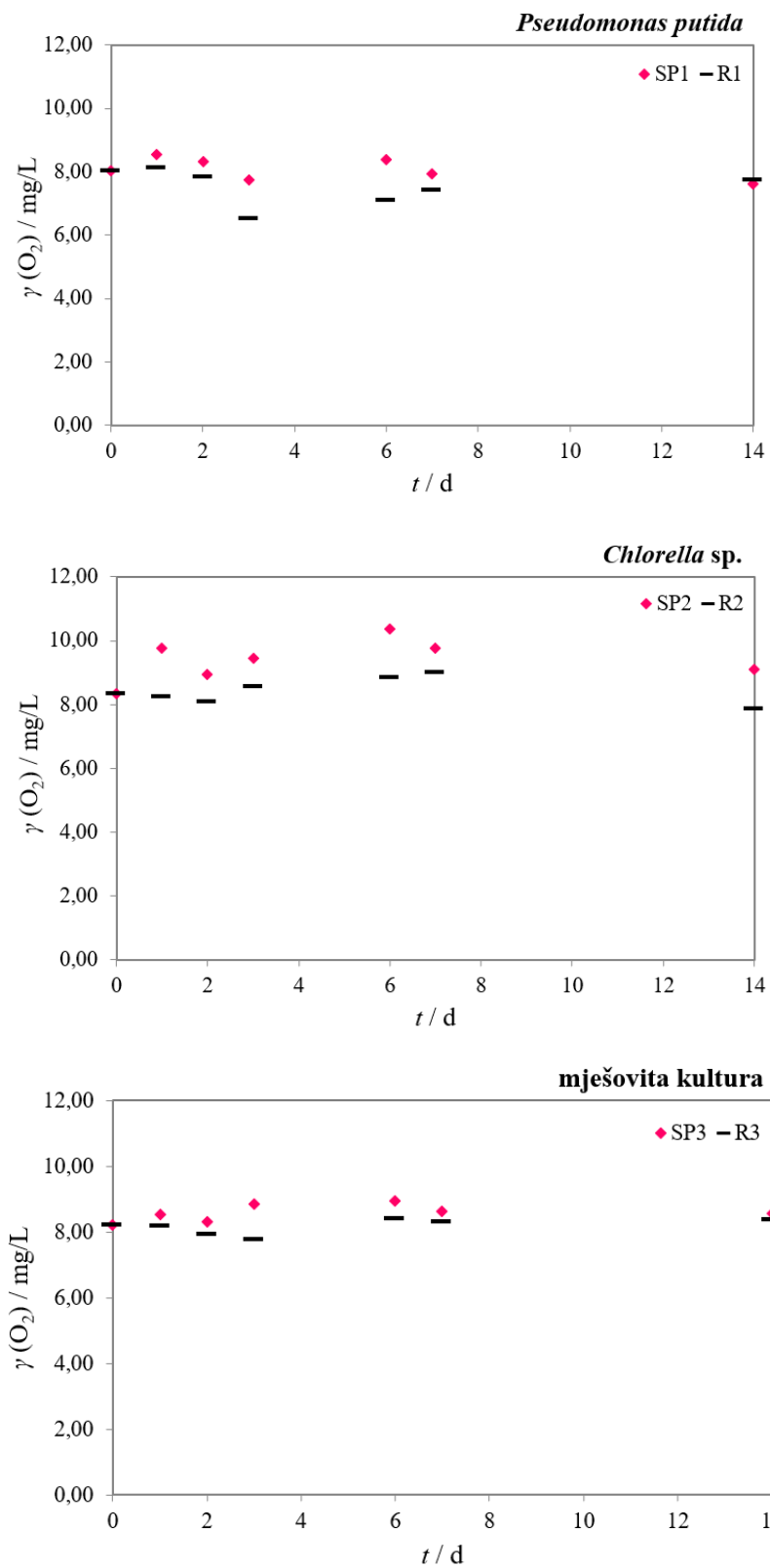


Slika 42 Učinkovitost biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata bakterijom *Pseudomonas putida*, mikroalgom *Chlorella sp.* i njihovom mješovitom kulturom tijekom drugog preliminarnog pokusa

Smanjenjem početne koncentracije smjese zabilježen je znatan porast učinkovitosti biorazgradnje cijanida i tiocijanata, dok je biorazgradnja fenola i dalje ostala visoka u svim eksperimentalnim varijantama.

Kao i u prvom preliminarnom pokusu, fenol je u potpunosti uklonjen iz otopine i to već na polovini trajanja pokusa u sva tri slučaja (R1, R2, R3). S druge strane, *Pseudomonas putida* (R1) uklonila je 42,86 % cijanida, *Chlorella* sp. (R2) uklonila je 52,70 % cijanida, a mješovita kultura (R3) 48,57 % cijanida. Iako je biorazgradnja tiocijanata i dalje ograničena, učinkovitost je viša u odnosu na prvi preliminarni pokus. Najveću učinkovitost biorazgradnje tiocijanata pokazala je mikroalga *Chlorella* sp. (33,43 %), dok su *Pseudomonas putida* i mješovita kultura postigle 19,21 %, odnosno 12,26 % biorazgradnje tiocijanata. Rezultati su pokazali da je reaktorska jedinica s mikroalgom *Chlorella* sp. (R2) pokazala najveći kapacitet biorazgradnje, što je u skladu s rezultatima prvog preliminarnog pokusa te korelira s CFU vrijednostima. Zbog navedenih rezultata mikroalga *Chlorella* sp. odabrana je kao modelni organizam u glavnom pokusu biorazgradnje i optimizaciji uvjeta procesa. Vrijeme trajanja glavnog pokusa biorazgradnje reducirano je na 7 dana obzirom da se nakon sedmog dana pokusa biorazgradnja stabilizira i ne pokazuje daljnji napredak.

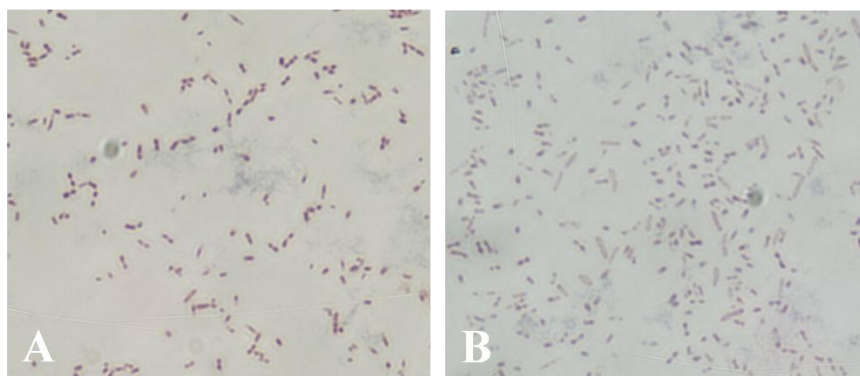
Slika 43 prikazuje promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe drugog preliminarnog pokusa.



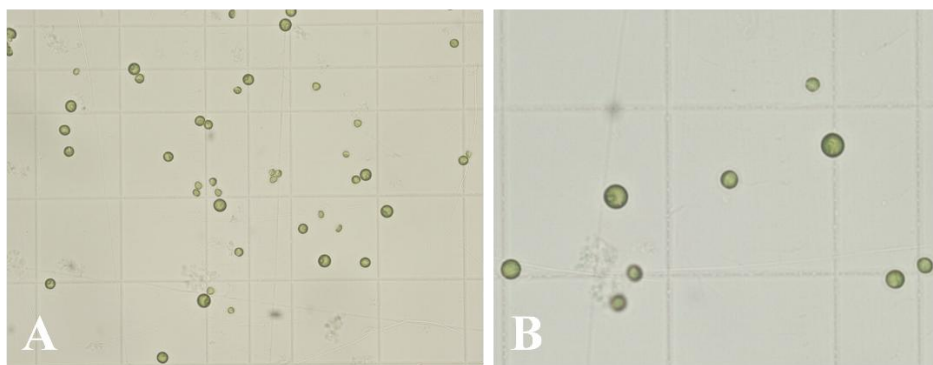
Slika 43 Promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe drugog preliminarnog pokusa

U svim reaktorskim jedinicama (R1, R2, R3) zabilježene su niže koncentracije otopljenog kisika u odnosu na njihove kontrole (SP1, SP2, SP3), što ukazuje na potrošnju kisika tijekom biološke razgradnje. U reaktorskoj jedinici s bakterijskom monokulturom *Pseudomonas putida* (R1) do izraženijeg pada koncentracije otopljenog kisika došlo je trećeg dana pokusa, što je u skladu s fazom intenzivnog metabolizma. U reaktorskoj jedinici s mikroalgom *Chlorella* sp. (R2) zabilježena je najveća razlika između koncentracije otopljenog kisika u smjesi fenola, cijanida i tiocijanata te kontrolnog uzorka (K2), što dodatno potvrđuje učinkovitost mikroalge u biorazgradnji. U reaktorskoj jedinici s mješovitom kulturom (R3), koncentracija otopljenog kisika bila je nešto niža nego u kontrolnom uzorku (K3), no nije zabilježen značajan pad tijekom pokusa. Umjesto toga, uočen je relativno stabilan profil koncentracije kisika, što upućuje na ograničenu mikrobiološku aktivnost i slab intenzitet biorazgradnje u tom sustavu.

Tijekom izvođenja preliminarnih pokusa, morfologija stanica bakterije i mikroalge praćena je mikroskopskom analizom. U oba pokusa nisu uočene vidljive morfološke promjene stanica bakterije ni mikroalge. **Slika 44** i **Slika 45** prikazuju mikrofotografije bakterije i mikroalge te potvrđuju očuvanost stanične strukture. Nisu uočene razlike između mikrobnih stanica u kontrolnim i testnim uzorcima.



Slika 44 Mikrofotografije trajnih preparata bakterije *Pseudomonas putida* obojane po Gramu, snimljene SEM-om pri povećanju od 1000 x u uzorku SP1 trećeg dana prvog preliminarnog pokusa (A) te u uzorku R1 trećeg dana drugog preliminarnog pokusa (B)



Slika 45 Mikrofotografije mikroalge *Chlorella* sp. snimljene SEM-om pri povećanju od 400 x u uzorku SP2 po završetku prvog preliminarnog pokusa (A) te u uzorku R2 po završetku drugog preliminarnog pokusa (B)

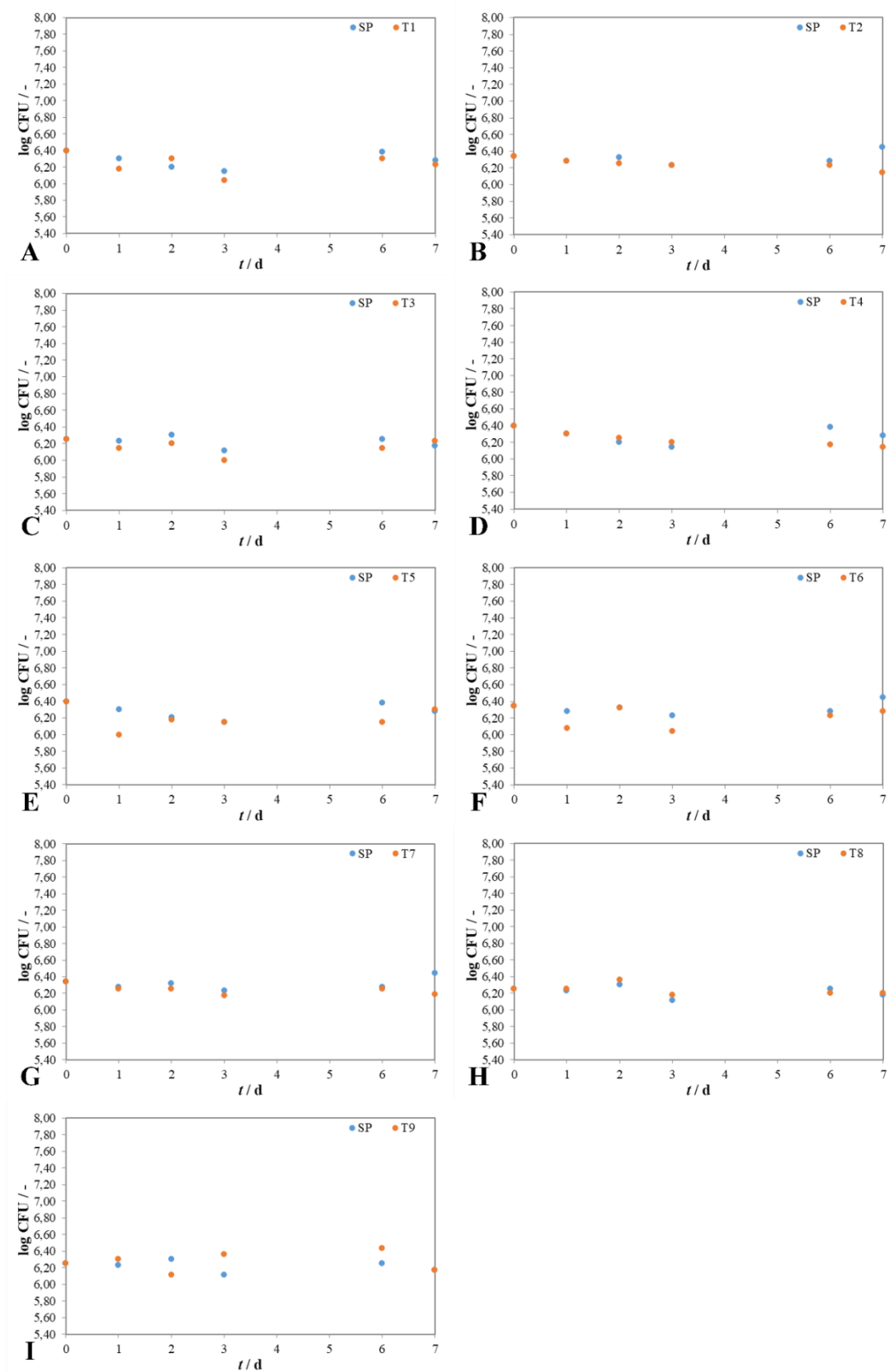
Rezultati testova toksičnosti s *Aliivibrio fischeri* nisu pokazali toksičnost filtrata zbog čega nisu prikazani u ovom radu.

4.2.3. Rezultati glavnog pokusa biorazgradnje

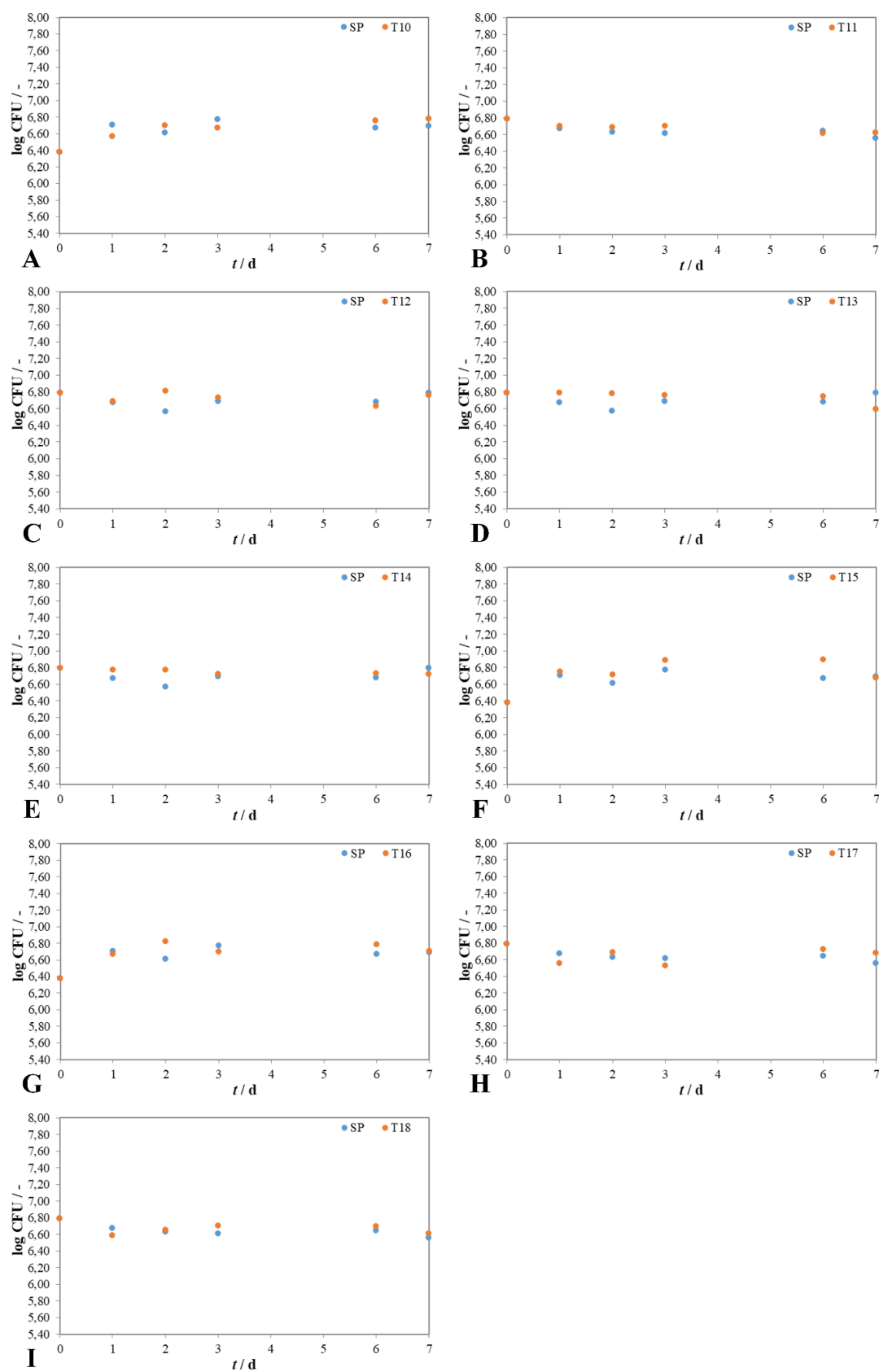
Cilj glavnog pokusa biorazgradnje bio je optimizirati proces biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata prema *Full Factorial* dizajnu. Na temelju rezultata preliminarnih pokusa, za provedbu glavnog pokusa biorazgradnje odabrana je mikroalga *Chlorella* sp., a trajanje pokusa skraćeno je s 14 na 7 dana zbog uočene stagnacije biorazgradnje nakon tog razdoblja. Dodatno, u glavnom pokusu biorazgradnje primijenjen je modificirani mineralni medij (**Tablica 20**). Promjena u sastavu mineralnog medija uvedena je zbog niske učinkovitosti biorazgradnje tiocijanata. Poznato je da tijekom razgradnje tiocijanata dolazi do stvaranja sulfata, amonijaka i ugljikova dioksida [111]. Prema studiji Rapera i sur. [113], amonijak pri koncentraciji od 316 mg/L ima inhibitorni učinak na razgradnju tiocijanata, dok sulfati u koncentracijskom rasponu od 80 do 2000 mg/L ne utječu značajno na taj proces. S obzirom na to da je mineralni medij upotrijebljen u preliminarnim pokusima sadržavao povišenu koncentraciju amonijaka koji je potencijalno mogao inhibirati biorazgradnju tiocijanata, za potrebe glavnog pokusa biorazgradnje sastav mineralnog medija je modificiran smanjenjem koncentracije amonijaka te zamjenom sulfata kloridima [124]. Modificirani mineralni medij formuliran je tako da bude prikladan za rast i metabolizam mikroalge, čime su osigurani optimalni uvjeti za evaluaciju biorazgradnog potencijala u različitim eksperimentalnim kombinacijama.

Tijekom glavnog pokusa biorazgradnje ispitivana su tri čimbenika: pH vrijednost, optička gustoća kulture i početna koncentracija smjese toksičnih tvari, pri čemu je svaki čimbenik ispitan na tri razine, sukladno opisu u poglavlju **3.3.3**. Kao odziv procesa uzet je postotak biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata, izračunat prema jednadžbi (35).

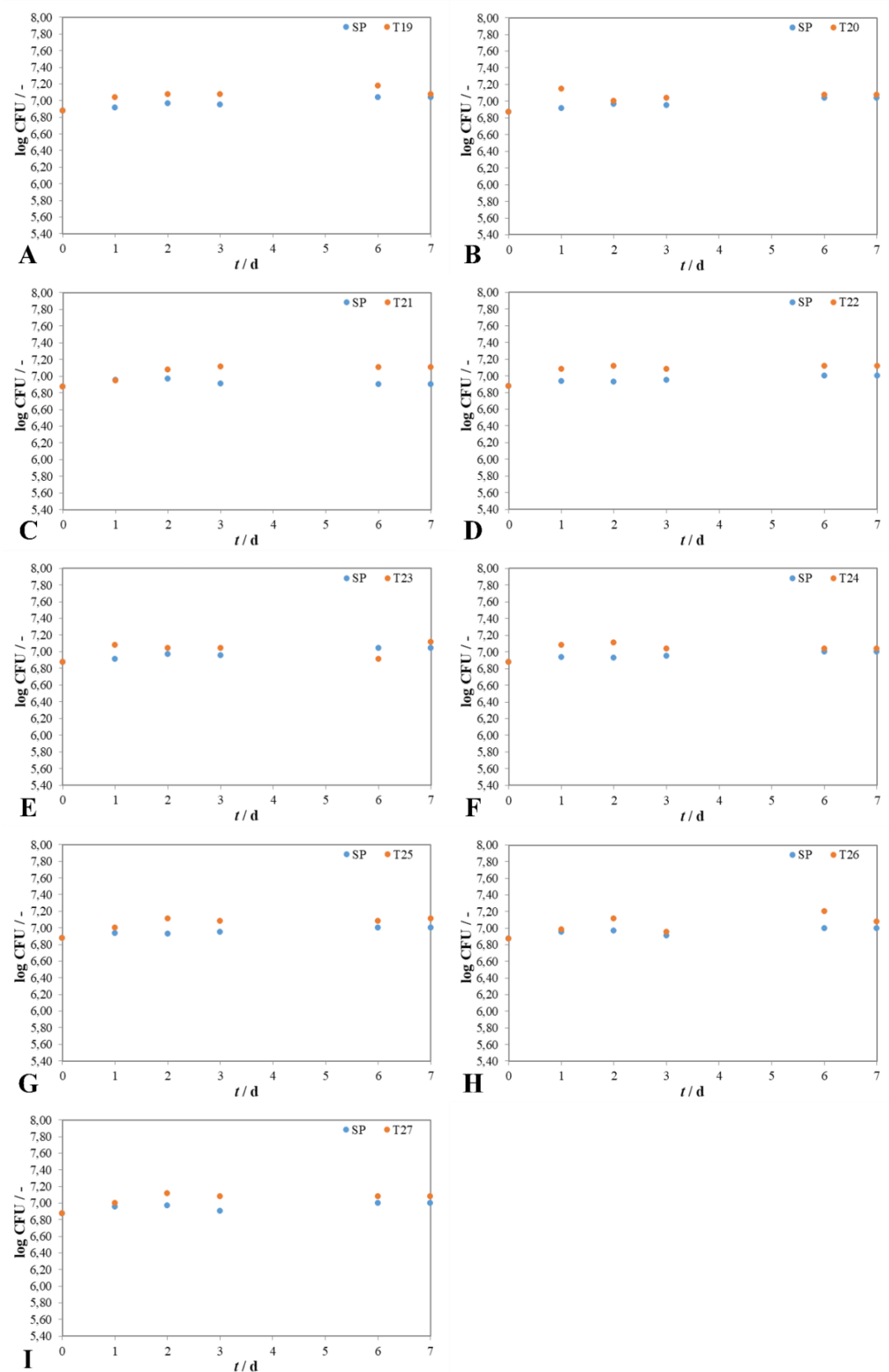
Tijekom glavnog pokusa biorazgradnje, broj živih stanica mikroalge izražen kao CFU praćen je u odabranim vremenskim točkama, a promjene logaritmiranih CFU vrijednosti prikazane su grafički u ovisnosti o vremenu. **Slika 46**, **Slika 47** i **Slika 48** prikazuju rezultate za tikvice T1 do T27 (vidi **Tablica 22**) te njihove pripadajuće kontrole (SP).



Slika 46 Promjena logaritamske CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 7 dana provedbe glavnog pokusa biorazgradnje u tikvicama T1 do T9



Slika 47 Promjena logaritamske CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 7 dana provedbe glavnog pokusa biorazgradnje u tikvicama T10 do T18



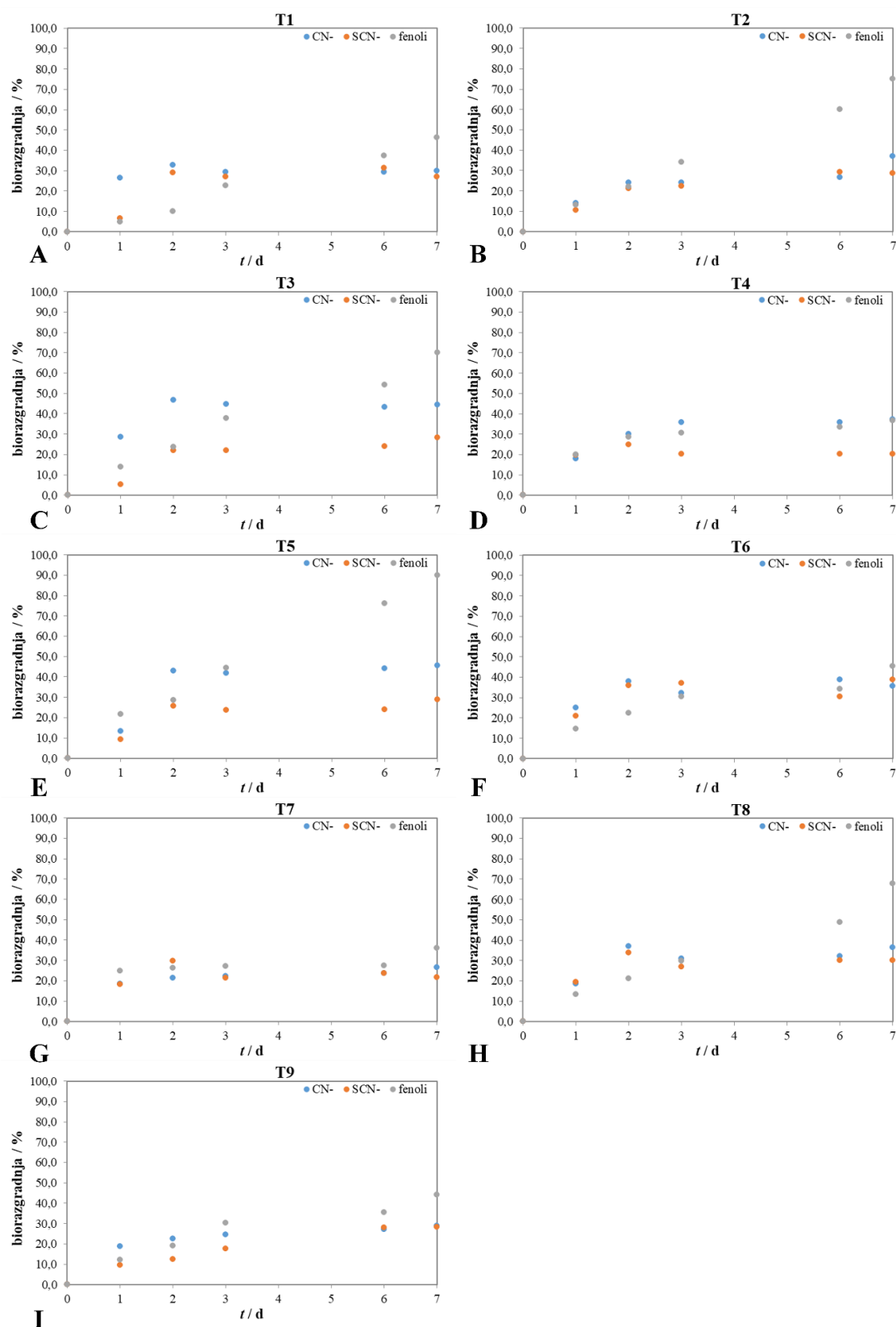
Slika 48 Promjena logaritamske CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 7 dana provedbe glavnog pokusa biorazgradnje u tikvicama T19 do T27

U reaktorskoj jedinici s početnom optičkom gustoćom suspenzije mikroalge 0,10 (tikvice T1 do T9), nije zabilježen porast CFU vrijednosti tijekom trajanja pokusa. U većini uzoraka, krajnje vrijednosti bile su niže od početnih, kao i od pripadajućih kontrola (SP). Primjerice, u uzorku T5 (pH 10, *c* 0,25 mmol/L) najveća zabilježena CFU vrijednost iznosila je $2,0 \times 10^6$ CFU/mL, za razliku od početne vrijednosti koja je iznosila $2,5 \times 10^6$ CFU/mL. S obzirom na izostanak rasta mikrobnih stanica, može se zaključiti da u uzorcima T1 do T9 nije došlo do značajne biorazgradnje.

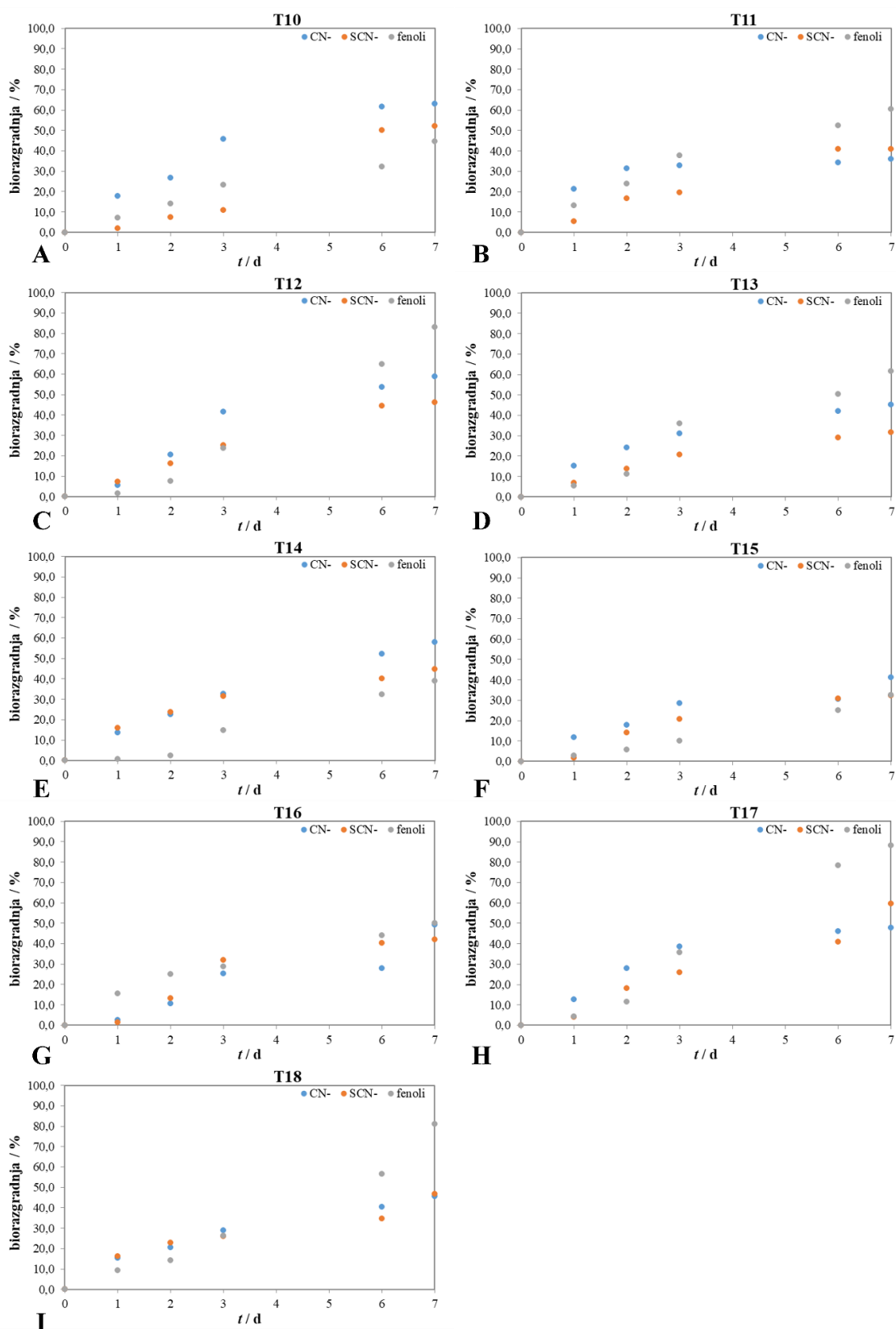
U reaktorskoj jedinici s početnom optičkom gustoćom suspenzije mikroalge 0,50 (tikvice T10 do T18), zabilježene su više CFU vrijednosti u odnosu na odgovarajuće kontrole (SP), osim u uzorcima T12, T13 i T14, u kojima je rast izostao. Najveći broj stanica u ovoj skupini uzoraka imala je tikvica T10 (pH 10, *c* 0,25 mmol/L), s CFU vrijednosti od $6,0 \times 10^6$ CFU/mL na kraju pokusa, što je porast u odnosu na početnih $2,4 \times 10^6$ CFU/mL i vrijednost viša od kontrolnog uzorka ($4,9 \times 10^6$ CFU/mL). Ovi rezultati ukazuju na prisutnu biorazgradnu aktivnost.

U reaktorskoj jedinici s početnom optičkom gustoćom suspenzije mikroalge 1,00 (tikvice T19 do T27), svi uzorci pokazali su stabilan i izražen porast CFU vrijednosti. Krajnje vrijednosti u svim slučajevima bile su više od kontrolnih (SP). Najviše CFU vrijednosti ($1,3 \cdot 10^7 \times$ CFU/mL) zabilježene su u uzorcima T21 (pH 8, *c* 0,25 mmol/L), T22 (pH 10, *c* 0,50 mmol/L), T23 (pH 6, *c* 0,75 mmol/L) i T25 (pH 10, *c* 0,25 mmol/L), uz početnu vrijednost od $7,5 \times 10^6$ CFU/mL. Analizom svih eksperimentalnih skupina može se uočiti da je najveći broj stanica mikroalge *Chlorella* sp. primijećen pri najnižoj koncentraciji smjese toksičnih tvari (0,25 mmol/L) i pH 10, što sugerira da upravo ti uvjeti najviše pogoduju rastu i aktivnosti mikroalge. Ipak, u skupini uzoraka s najvišom vrijednosti optičke gustoće suspenzije mikroalge (1,00) (tikvice T19 do T27) zabilježen je dosljedno veći broj stanica mikroalge u više različitih kombinacija uvjeta, što ukazuje na to da je optička gustoća najvažniji pojedinačni čimbenik koji utječe na učinkovitost biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata u ovom sustavu.

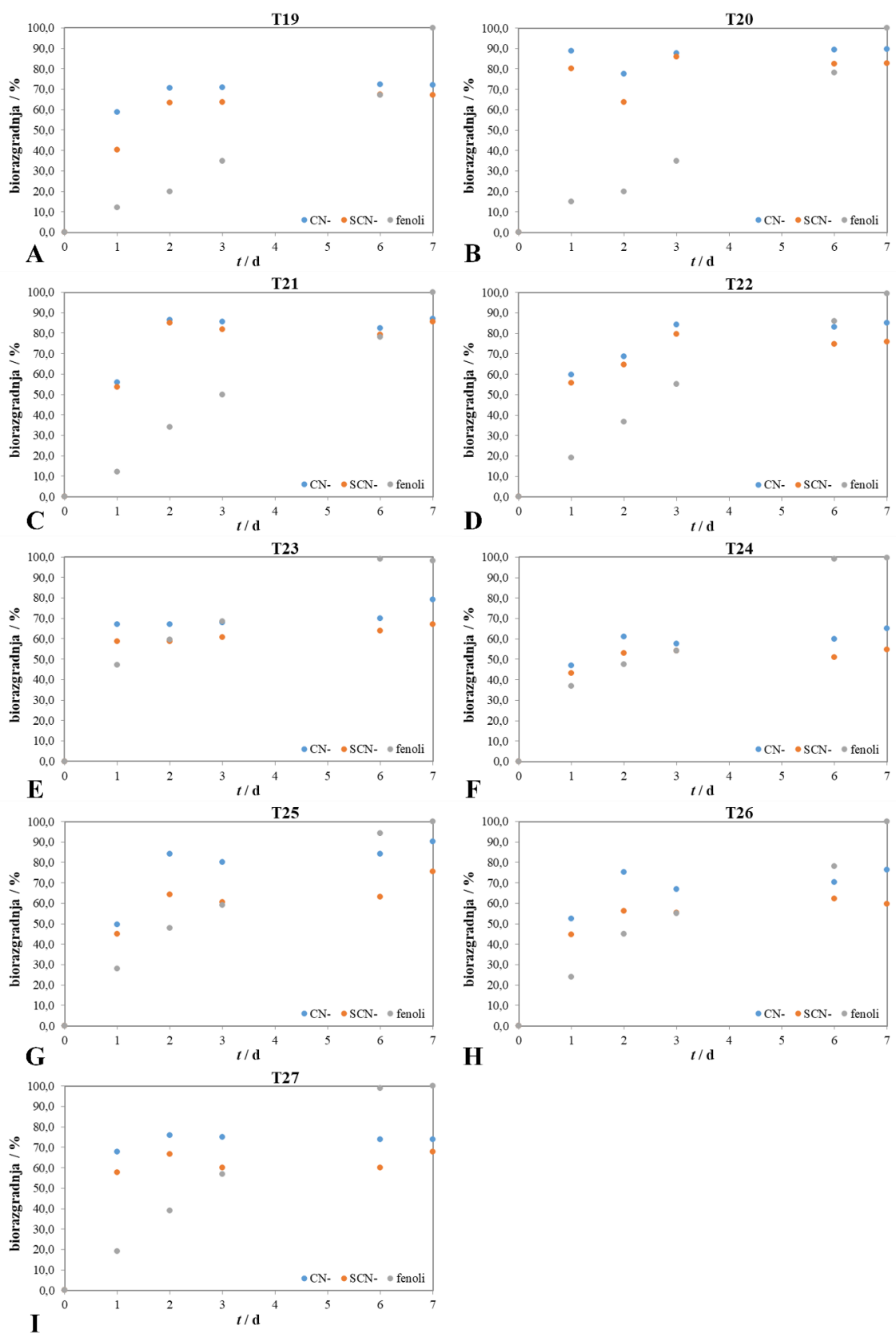
Tijekom sedam dana trajanja glavnog pokusa biorazgradnje, analizirana je i koncentracija fenola, cijanida i tiocijanata iz kojih je izračunata učinkovitost biorazgradnje. Kod svih uzoraka uočen je gotovo linearan porast učinkovitosti biorazgradnje fenola kroz vrijeme, dok su kod cijanida i tiocijanata vrijednosti učinkovitosti biorazgradnje u većini uzoraka rasle tijekom prva tri dana, nakon čega su se stabilizirale. Rezultati su prikazani u obliku grafikona kroz promjenu vrijednosti biorazgradnje (%) tijekom vremena u tikvicama T1 do T9 (**Slika 49**), T10 do T18 (**Slika 50**) i T19 do T27 (**Slika 51**).



Slika 49 Učinkovitost biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata mikroalgom *Chlorella* sp. tijekom glavnog pokusa biorazgradnje u tikvicama T1 do T9



Slika 50 Učinkovitost biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata mikroalgom *Chlorella* sp. tijekom glavnog pokusa biorazgradnje u tikvicama T10 do T18



Slika 51 Učinkovitost biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata mikroalgom *Chlorella* sp. tijekom glavnog pokusa biorazgradnje u tikvicama T19 do T27

U reaktorskoj jedinici s početnom optičkom gustoćom suspenzije mikroalge 0,10 (tikvice T1 do T9), zabilježena je najveća učinkovitost biorazgradnje fenola, zatim cijanida, dok je biorazgradnja tiocijanata najslabija. Najpovoljniji rezultat u ovoj skupini postignut je u uzorku T5 (pH 10, c 0,25 mmol/L), u kojemu je razgrađeno 90,00 % fenola, 45,47 % cijanida i 29,01 % tiocijanata.

U reaktorskoj jedinici s početnom optičkom gustoćom suspenzije mikroalge 0,50 (tikvice T10 do T18), najbolji rezultat postignut je u uzorku T17, s učinkovitosti biorazgradnje fenola od 88,00 %, cijanida 47,90 % i tiocijanata 59,55 %.

U reaktorskoj jedinici s početnom optičkom gustoćom suspenzije mikroalge 1,00 (tikvice T19 do T27), svi su uzorci pokazali visoku učinkovitost biorazgradnje. Najveći postotak biorazgradnje zabilježen je u uzorku T21, gdje je fenol u potpunosti razgrađen, a cijanid i tiocijanat 87,12 %, odnosno 85,61 %.

Ukupna analiza pokazuje da se najveća učinkovitost biorazgradnje postiže pri najnižoj početnoj koncentraciji onečišćujuće smjese (0,25 mmol/L) i pri pH 10. Najizraženiji utjecaj na učinkovitost biorazgradnje ipak je imala koncentracija biomase mikroalge izražena kao optička gustoća suspenzije. Kada je optička gustoća suspenzije iznosila 1,00, učinkovitost biorazgradnje bila je najveća neovisno o ostalim procesnim uvjetima.

Niže koncentracije onečišćujućih tvari smanjuju toksični učinak na mikroorganizme, čime omogućuju stabilniji metabolizam i bolju aktivnost. Povećane koncentracije fenola, cijanida i tiocijanata mogu uzrokovati inhibiciju staničnog metabolizma i rasta, jer zahtijevaju veći energetske utrošak za procese detoksikacije. Prema literaturi, fenoli u smjesama dodatno umanjuju učinkovitost biorazgradnje, djelomično zbog stvaranja toksičnih međuprodukata te inhibicije enzima [11, 93]. Razgradnja fenola uključuje djelovanje specifičnih enzima fenol hidroksilaze, katehol dioksigenaze i mukonat ciklo izomerase, a razgradnja cijanida nitrilaze i cijanaze [144]. Međutim, toksičnost spojeva poput cijanida i tiocijanata može dovesti do smanjenja aktivnosti ovih enzima čak i pri niskim koncentracijama [13], dok povišene koncentracije tiocijanata mogu inhibirati aktivnost cijanaze, enzima ključnog za razgradnju cijanida [113]. Tiocijanati su, kao i u preliminarnim pokusima, pokazali najniži stupanj biorazgradnje. Iako su manje toksični za *Chlorella* sp. u usporedbi s fenolom i cijanidom, riječ je o kemijski stabilnijim spojevima, što otežava njihovu biološku razgradnju. Uz to, poznato je da se tiocijanati mogu sekundarno formirati tijekom prirodne detoksikacije cijanida, što može dodatno otežati njihovo uklanjanje iz sustava [145]. Unatoč tome, postotak biorazgradnje tiocijanata bio je značajno viši u glavnom pokusu biorazgradnje nego u preliminarnim pokusima, što se može pripisati modifikaciji mineralnog medija.

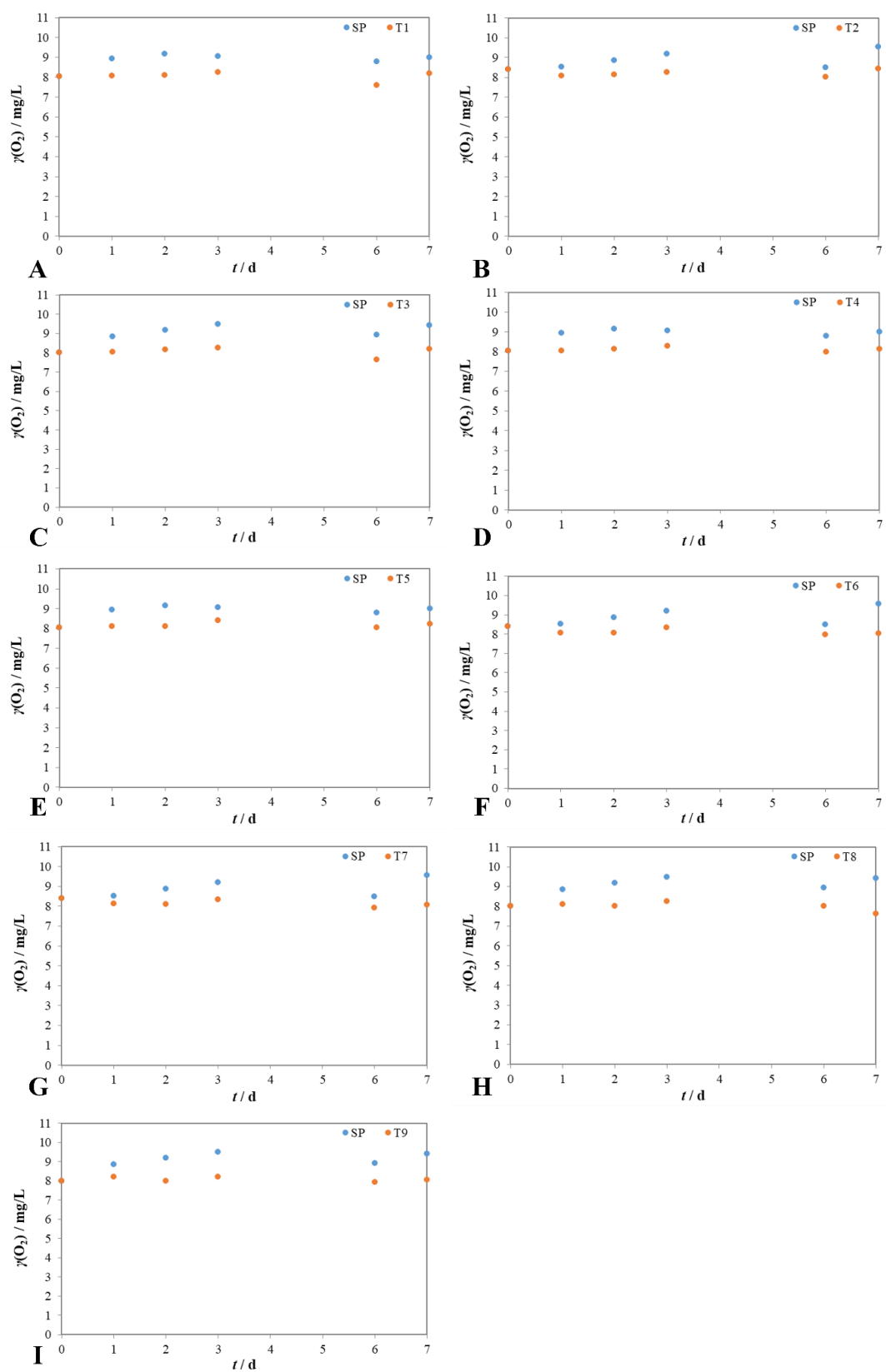
Tijekom pripreme glavnog pokusa biorazgradnje, pH vrijednost svakog uzorka podešena je na ciljane razine od 6, 8 ili 10, uz prihvaćenu mjernu nesigurnost od $\pm 0,15$, koja se može pripisati greškama tijekom mjerenja. Sedmog dana pokusa ponovno su izmjerene pH vrijednosti svih uzoraka. **Tablica 29** prikazuje početne i krajnje pH vrijednosti u uzorcima T1 do T27. Uočeno je da su se tijekom pokusa pH vrijednosti svih uzoraka približile neutralnom do slabo bazičnom rasponu (7,5 – 8), bez obzira na inicijalno postavljenu pH vrijednost.

Tablica 29 Prikaz pH vrijednosti uzoraka T1 do T27 prije i nakon glavnog pokusa biorazgradnje

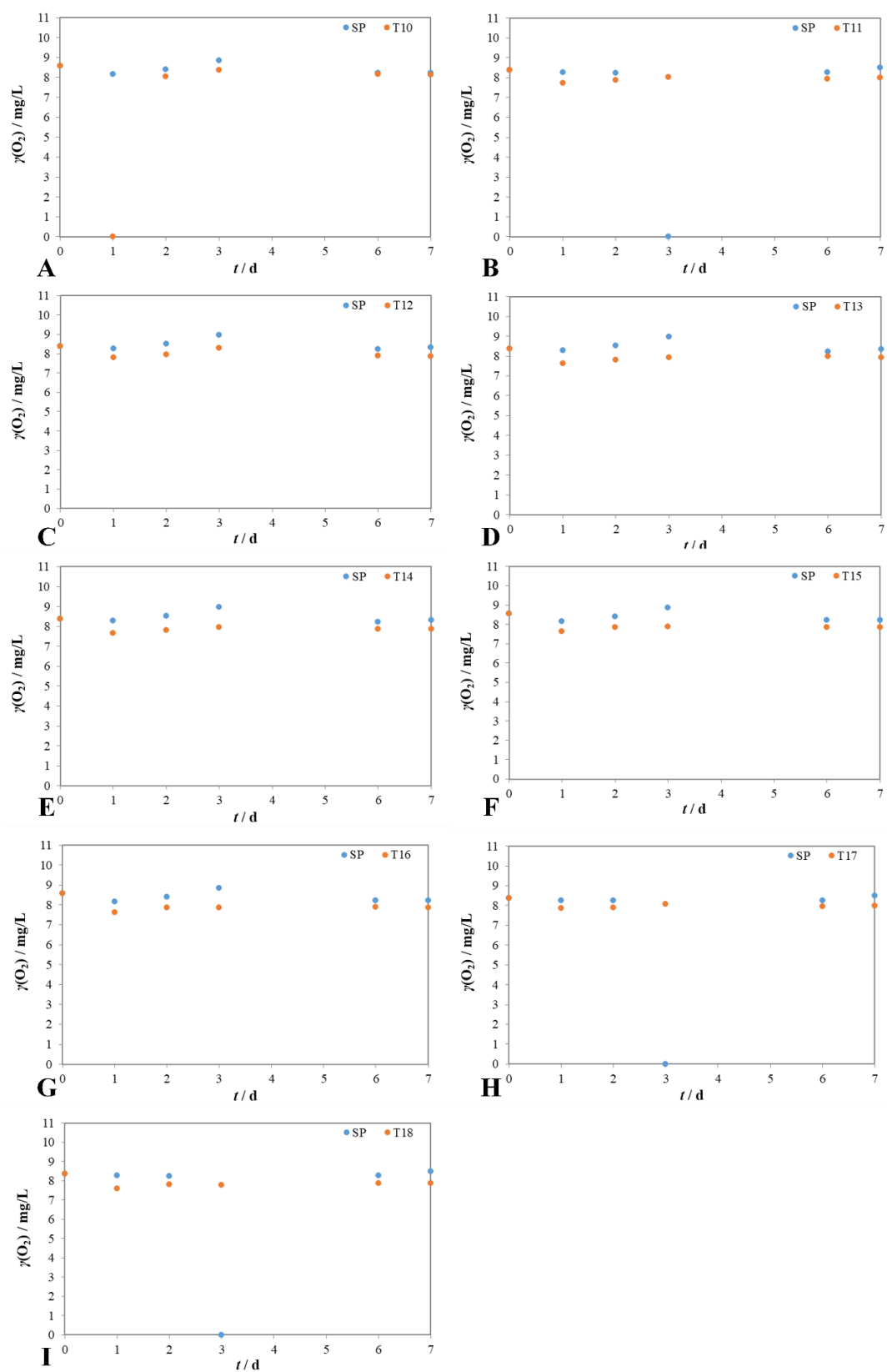
tikvica	početni pH	konačni pH
T1	10,00	8,12
T2	6,00	7,43
T3	8,00	7,68
T4	10,00	8,54
T5	10,00	8,36
T6	6,00	7,16
T7	6,00	7,23
T8	8,00	8,11
T9	8,00	8,22
T10	10,00	8,22
T11	6,00	7,36
T12	8,00	7,86
T13	8,00	7,95
T14	8,00	8,01
T15	10,00	8,29
T16	10,00	8,30
T17	6,00	7,32
T18	6,00	7,25
T19	6,00	8,33
T20	6,00	8,63
T21	8,00	8,72
T22	10,00	8,68
T23	6,00	8,10
T24	10,00	8,48
T25	10,00	9,14
T26	8,00	8,40
T27	8,00	8,38

Ovaj pH raspon odgovara optimalnim uvjetima za rast mikroalge *Chlorella* sp. [146]. Prema dostupnoj literaturi, optimalna pH vrijednost za aktivnost enzima uključenih u biorazgradnju cijanida nalaze se između 6 i 9, dok se najviša učinkovitost biorazgradnje tiocijanata postiže pri alkalnim uvjetima, osobito pri pH 10 [147]. Dodatno, promjene pH tijekom pokusa mogu biti posljedica kemijske ravnoteže povezane s disocijacijom fenola, pri čemu pri višim pH vrijednostima dolazi do stvaranja fenolata i vodikovih iona [11]. Ovakva dinamika pH vrijednosti u skladu je s literaturnim podacima, prema kojima dolazi do pada pH vrijednosti uslijed stvaranja kiselih metabolita tijekom početnih faza rasta, nakon čega nastupa alkalizacija medija kao posljedica iscrpljivanja izvora ugljika i promjene metaboličke aktivnosti stanica [143]. Utjecaj pH na učinkovitost biorazgradnje detaljnije je analiziran pomoću odzivnih površina, koje će biti prikazane i interpretirane u sljedećem poglavlju.

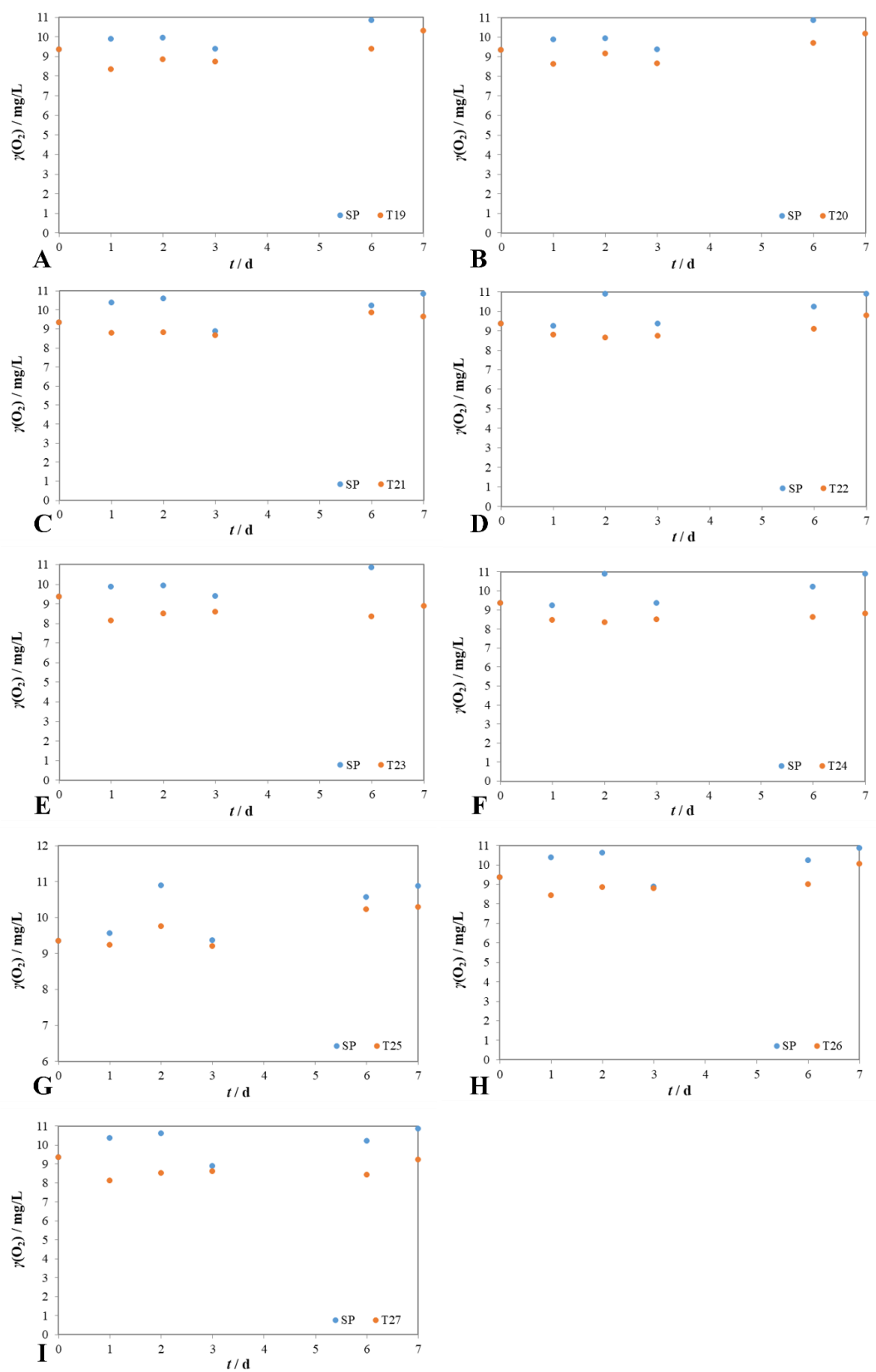
Koncentracija otopljenog kisika praćena je tijekom glavnog pokusa biorazgradnje. Rezultati su prikazani u obliku grafikona kao ovisnost koncentracije kisika u tikvicama T1 do T9 (**Slika 52**), T10 do T18 (**Slika 53**) i T19 do T27 (**Slika 54**). o vremenu.



Slika 52 Promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe glavnog pokusa u tikvicama T1 do T10



Slika 53 Promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe glavnog pokusa u tikvicama T11 do T19



Slika 54 Promjene koncentracija otopljenog kisika tijekom provedbe glavnog pokusa u tikvicama T19 do T27

Pri početnoj optičkoj gustoći suspenzije mikroalge 0,10 (tikvice T1 do T9), zabilježena je stabilna koncentracija otopljenog kisika tijekom prva tri dana pokusa, nakon čega slijedi pad koncentracije kisika do šestog dana pokusa. S obzirom na nisku vrijednost optičke gustoće i slabiju učinkovitost biorazgradnje, može se pretpostaviti da je mikrobna aktivnost u ovim uzorcima bila usporena te je potrošnja kisika nastupila tek nakon inicijalne faze prilagodbe mikroalge na dane uvjete.

Pri početnoj optičkoj gustoći suspenzije mikroalge 0,50 (tikvice T10 do T18), pad koncentracije otopljenog kisika zabilježen je već u prvom danu pokusa, a u narednim danima vrijednosti ostaju relativno stabilne. Ovakav profil ukazuje na raniji početak biorazgradnje u odnosu na prvu skupinu, što je u skladu s višom početnom koncentracijom biomase u sustavu.

Pri početnoj optičkoj gustoći suspenzije mikroalge 1,00 (tikvice T19 do T27), uočene su najizraženije promjene u koncentraciji otopljenog kisika. Do pada koncentracije kisika dolazi već prvog dana, slijedi stagnacija pa blagi porast nakon trećeg dana. Ovakav trend može se povezati s intenzivnom početnom mikrobnom aktivnošću i naknadnom prilagodbom mikroalgi na uvjete u mediju.

Niža koncentracija otopljenog kisika u uzorcima T1 do T27 u odnosu na odgovarajuće kontrolne uzorke (SP) ukazuju na prisutnost biorazgradnje tijekom koje je mikroalga trošila kisik. Najveći pad koncentracije kisika i najveća učinkovitost biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata zabilježeni su u uzorcima T19 do T27, što dodatno potvrđuje važnost početne koncentracije biomase u procesu biorazgradnje.

Toksičnost smjese fenola, cijanida i tiocijanata koncentracija 0,25 mmol/L, 0,75 mmol/L i 1,00 mmol/L prije pokusa biorazgradnje te filtrata T1 do T27 nakon pokusa biorazgradnje procijenjena je primjenom standardiziranog testa inhibicije luminiscencije s morskom bakterijom *Aliivibrio fischeri*. **Tablica 30** prikazuje rezultate testa toksičnosti. Toksičnost je izražena preko EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, pri čemu niže vrijednosti upućuju na viši toksični učinak na testni organizam.

Tablica 30 Usporedba toksičnosti smjesa fenola, cijanida i tiocijanata prije i nakon (T1 – T27) biorazgradnje primjenom testa s *Aliivibrio fischeri*

uzorak	EC ₂₀ [%]	EC ₅₀ [%]
prije pokusa biorazgradnje		
smjesa 0,25 mmol/L	-	11,19
smjesa 0,50 mmol/L	-	9,42
smjesa 0,75 mmol/L	4,42	15,56
poslije pokusa biorazgradnje		
T1	9,97	-
T2	-	9,91
T3	-	5,91
T4	26,63	39,93
T5	-	12,04
T6	6,65	-
T7	5,09	23,99
T8	2,42	9,32
T9	1,87	11,57
T10	-	12,40
T11	11,32	27,61
T12	10,94	29,42
T13	-	10,33
T14	-	9,30
T15	-	6,53
T16	-	-
T17	14,16	-
T18	-	7,28
T19	-	9,68
T20	0,23	-
T21	4,57	26,24
T22	-	7,97
T23	-	6,35
T24	3,41	13,06
T25	-	16,63
T26	-	19,82
T27	2,81	13,02

Prema dobivenim rezultatima, najmanju toksičnost pokazao je uzorak T4 (EC_{20} 26,63 %, EC_{50} 39,93 %), u kojem je učinkovitost biorazgradnje bila relativno niska (31,46 %). Suprotno tome, uzorak T20 pokazao je najvišu toksičnost (EC_{20} 0,23 %) iako je u njemu zabilježena vrlo visoka učinkovitost biorazgradnje (90,84 %). Sličan trend uočen je i kod uzoraka T22 i T23, u kojima su postotci biorazgradnje iznosili 86,79 % i 78,65 %, dok su EC_{50} vrijednosti bile izrazito niske (7,97 % i 6,35 %), što ukazuje na pojačan toksični učinak unatoč zadovoljavajućem postotku biorazgradnje. Zanimljivo je da su i uzorci s nižom učinkovitošću biorazgradnje, poput T2, T3 i T15, također pokazali znatno snižene EC vrijednosti u odnosu na početnu smjesu. Ovi rezultati upućuju na moguću pojavu toksičnih nusprodukata tijekom procesa biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata, koji mogu imati negativan utjecaj na testni organizam. Budući da EC vrijednosti u smjesama odražavaju kumulativni učinak svih prisutnih komponenata, uključujući i razgradne produkte, rezultati ukazuju na složenu prirodu toksičnih odgovora [93]. Istraživanje Marugana i sur. [40] također je potvrdilo visoku osjetljivost *Aliivibrio fischeri* na fenole i cijanide te osobito na razgradne produkte nastale tijekom naprednih oksidacijskih procesa, što dodatno podupire dobivene rezultate.

4.2.4. Optimizacija procesa biorazgradnje

Optimizacija procesa biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata provedena je u glavnom pokusu biorazgradnje, prema *Full Factorial* dizajnu, s tri varijable ispitane na tri razine (3^3). Kao varijable ispitane su:

- početna koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata (0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L i 0,75 mmol/L),
- optička gustoća suspenzije mikroalge (0,1, 0,5 i 1,0) te
- početna pH vrijednost medija (6, 8 i 10).

Eksperimentalni dizajn i analiza podataka provedeni su primjenom softverskog paketa Design-Expert (v13, Stat-Ease Inc., SAD, 2025).

Tablica 31 prikazuje kombinacije varijabli i pripadajuće odzive procesa, izražene kao postotci biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata. U svrhu razvoja predikcijskog modela primijenjeno je višekriterijsko odlučivanje (engl. *multi-criteria decision making*) s ciljem maksimizacije biorazgradnje svih triju spojeva. Budući da je riječ o više zavisnih varijabli, ukupna učinkovitost sustava definirana je kao aritmetička sredina postotaka biorazgradnje fenola, cijanida i tiocijanata, pri čemu su sve tri varijable imale jednak težinski faktor. Tako

dobiven objedinjeni odziv poslužio je za statističku analizu utjecaja pojedinih čimbenika i njihovih međusobnih interakcija.

Tablica 31 Varijable i odzivi procesa u optimizaciji biorazgradnje

uzorak	c (smjese) [mmol/L]	optička gustoća [-]	pH [-]	učinkovitost biorazgradnje [%]
	A	B	C	
T1	0,50	0,10	10,00	34,45
T2	0,25	0,10	6,00	46,86
T3	0,25	0,10	8,00	47,52
T4	0,75	0,10	10,00	31,46
T5	0,25	0,10	10,00	54,83
T6	0,50	0,10	6,00	39,98
T7	0,75	0,10	6,00	28,13
T8	0,50	0,10	8,00	44,74
T9	0,75	0,10	8,00	33,77
T10	0,25	0,50	10,00	53,16
T11	0,75	0,50	6,00	45,83
T12	0,25	0,50	8,00	62,77
T13	0,75	0,50	8,00	46,12
T14	0,50	0,50	8,00	47,14
T15	0,75	0,50	10,00	35,40
T16	0,50	0,50	10,00	47,14
T17	0,25	0,50	6,00	65,15
T18	0,50	0,50	6,00	57,79
T19	0,50	1,00	6,00	79,71
T20	0,25	1,00	6,00	90,84
T21	0,25	1,00	8,00	90,91
T22	0,50	1,00	10,00	86,79
T23	0,75	1,00	6,00	78,65
T24	0,75	1,00	10,00	73,11
T25	0,25	1,00	10,00	88,59
T26	0,50	1,00	8,00	78,68
T27	0,75	1,00	8,00	80,59

Rezultati kvadratnog modela odziva dobiveni su metodologijom odzivne površine, a prikazani su analizom varijance. **Tablica 32** prikazuje rezultate analize varijance koja je provedena s ciljem procjene statističke značajnosti pojedinih čimbenika unutar razvijenog modela odziva. Ova statistička analiza omogućuje kvantitativnu procjenu utjecaja pojedinih čimbenika, njihovih međusobnih interakcija i nelinearnih učinaka na odziv sustava, odnosno ukupnu učinkovitost biorazgradnje. RSM pristup omogućava ne samo identifikaciju značajnih varijabli, već i modeliranje odziva u odnosu na promjene u više ulaznih čimbenika simultano. Svaki element tablice ima točno definirano značenje:

- Zbroj kvadrata (engl. *Sum of Squares*, SS) označava ukupnu varijabilnost u odzivu koju objašnjava određeni izvor, bilo da je riječ o glavnim čimbenicima (koncentracija smjese (A), optička gustoća (B) ili pH vrijednost (C)), njihovim interakcijama (npr. AB) ili kvadratnim članovima (npr. B²). Veći SS upućuje na veći doprinos tog čimbenika ukupnoj varijabilnosti odziva. Ukupan zbroj kvadrata (*Total SS*) predstavlja ukupnu varijabilnost svih eksperimentalnih rezultata, dok se rezidualni SS odnosi na varijabilnost koju model nije uspio objasniti.
- Stupnjevi slobode (engl. *Degrees of Freedom*, df) definiraju broj nezavisnih vrijednosti koje sudjeluju u procjeni varijabilnosti za pojedini izvor. Za glavne čimbenike df je obično 1, dok model kao cjelina ima onoliko stupnjeva slobode koliko sadrži izraza. Rezidualni df određuje se kao razlika između ukupnog broja pokusa i broja parametara u modelu.
- Kvadrat srednje vrijednosti (engl. *Mean Square*, MS) izračunava se dijeljenjem SS s pripadajućim df, te predstavlja prosječnu varijaciju koju pojedini čimbenik doprinosi odzivu.
- F-vrijednost (engl. *F-value*) predstavlja omjer između kvadrata srednje vrijednosti pojedinog čimbenika i rezidualne srednje vrijednosti. Što je F-vrijednost viša, to je vjerojatnije da učinak nije slučajan, već da čimbenik značajno utječe na odziv. F-test je standardna komponenta u validaciji RSM modela jer omogućuje procjenu kvalitete modela i identifikaciju relevantnih varijabli.
- p-vrijednost (engl. *p-value*) predstavlja vjerojatnost da je dobiveni učinak rezultat slučajnosti. Vrijednosti manje od 0,05 obično se tumače kao statistički značajne, što znači da je doprinos određenog čimbenika modelu opravdan i nije posljedica slučajne varijacije. U kontekstu RSM-a, niska p-vrijednost potvrđuje da uključivanje pojedinog

izraza (čimbenika, interakcije ili kvadratnog člana) značajno poboljšava prediktivnu moć modela.

Tablica 32 Analiza varijance modela

izvor	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost	
model	10246,45	9	1138,49	54029	< 0,0001	značajan
A	1190,10	1	1190,10	56,75	< 0,0001	
B	8281,42	1	8281,42	394,88	< 0,0001	
C	44,03	1	44,03	2,10	0,1656	
AB	28,122	1	28,12	1,34	0,2629	
AC	3,42	1	3,42	0,1633	0,6912	
BC	1,20	1	1,20	0,0572	0,8139	
A²	8,0	1	8,02	0,3824	0,5445	
B²	391,35	1	391,35	18,66	0,0005	
C²	13,15	1	13,15	0,6271	0,4393	
rezidual	356,52	17	20,97			
ukupna korekcija	10602,97	26				

Među analiziranim čimbenicima, statistički značajnima pokazali su se oni označeni kao A, B i B². Čimbenik A predstavlja početnu koncentraciju smjese fenola, cijanida i tiocijanata, dok se čimbenik B odnosi na optičku gustoću mikroalge *Chlorella* sp., koja je mjera početne biomase. Kvadratni član B² upućuje na nelinearan učinak gustoće mikroalgi na učinkovitost biorazgradnje. Rezultati pokazuju da su koncentracija onečišćujuće smjese (A) i početna biomasa mikroalgi (B) imali znatno veći utjecaj na ukupnu učinkovitost procesa biorazgradnje u usporedbi s pH (C), koji se u ovom modelu nije pokazao statistički značajnim. Drugim riječima, promjene u pH vrijednosti nisu dovele do značajnih promjena u ishodu procesa biorazgradnje, dok su promjene u koncentraciji onečišćujućih tvari i količini mikroalge imale važnu ulogu. Vrijednost F-testa za model iznosi 54,29, što ukazuje na visoku statističku značajnost cijelog modela. Ova vrijednost govori u prilog tome da postoji mala vjerojatnost da su dobiveni rezultati posljedica slučajnosti. Dodatno, p-vrijednost manja od 0,05 potvrđuje da su pojedini čimbenici unutar modela značajno doprinijeli varijabilnosti odziva, odnosno učinkovitosti biorazgradnje. Ukupna varijabilnost eksperimentalnih podataka iznosi 10 602,97, od čega model objašnjava 10 246,45, što predstavlja 96,6 % ukupne varijacije odziva. Ostatak, odnosno 356,52, pripisuje se rezidualnoj pogrešci.

Tablica 33 prikazuje rezultate statističke analize odabranog kvadratnog modela procesa.

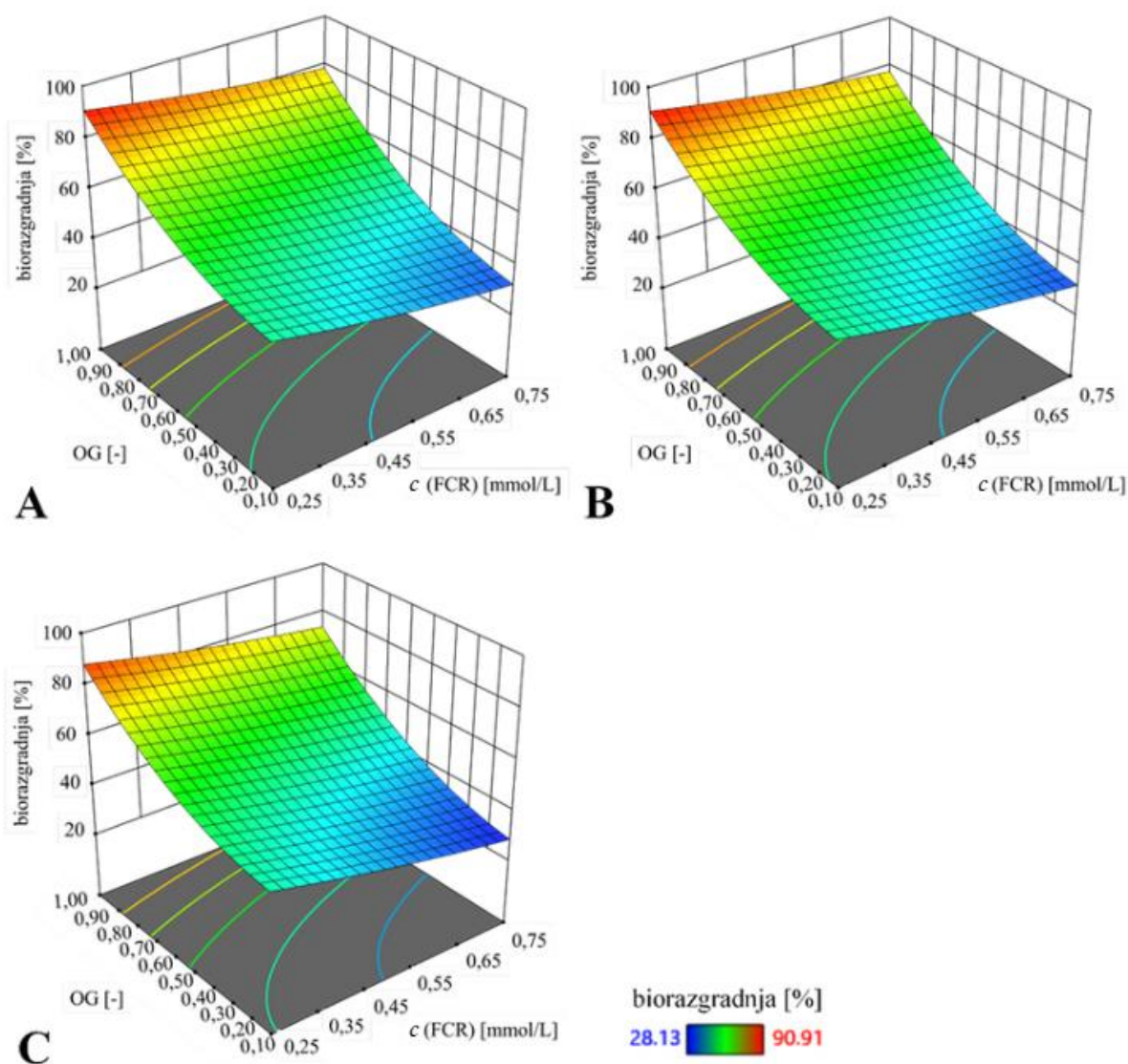
Tablica 33 Rezultati statističke analize odabranog kvadratnog modela procesa

statistički parametri	vrijednost
SD	4,58
srednja vrijednost	58,15
koeficijent varijacije [%]	7,88
R^2	0,9664
prilagođeni R^2	0,9486
predviđeni R^2	0,9158
adekvatna preciznost	22,4051

Valjanost i prikladnost modela ocijenjena je na temelju ključnih statističkih parametara. Jedan od kriterija pouzdanosti je sličnost između predviđenog i prilagođenog koeficijenta determinacije R^2 . Razlika između tih vrijednosti ne bi smjela biti veća od 0,20. U ovom slučaju, predviđeni R^2 iznosi 0,9158, dok je prilagođeni R^2 0,9486, što potvrđuje visoku usklađenost i pouzdanost modela. Dodatnu potvrdu prikladnosti modela daje i vrijednost tzv. adekvatne preciznosti, koja treba biti veća od 4 da bi model bio statistički značajan. Dobivena vrijednost iznosi 22,405, što višestruko nadmašuje minimalni prag, potvrđujući da je model prikladan za navigaciju unutar prostora dizajna.

Slika 55, **Slika 56** i **Slika 57** prikazuju odzivne površine generirane kvadratnim modelom. Crvena područja označavaju visoke postotke biorazgradnje, dok plava područja predstavljaju vrijednosti odziva. Kao što je ranije navedeno, optimizacija procesa temeljila se na trima varijablama: pH vrijednosti, optičkoj gustoći kulture i koncentraciji smjese fenola, cijanida i tiocijanata. Za svaku varijablu definirane su tri razine, a odzivne površine prikazuju međusobne interakcije između dvije varijable, dok je treća konstantna. Ovi trodimenzionalni grafički prikazi omogućuju vizualnu interpretaciju područja unutar kojih se postiže najviša učinkovitost biorazgradnje, a time i identifikaciju optimalnih uvjeta procesa.

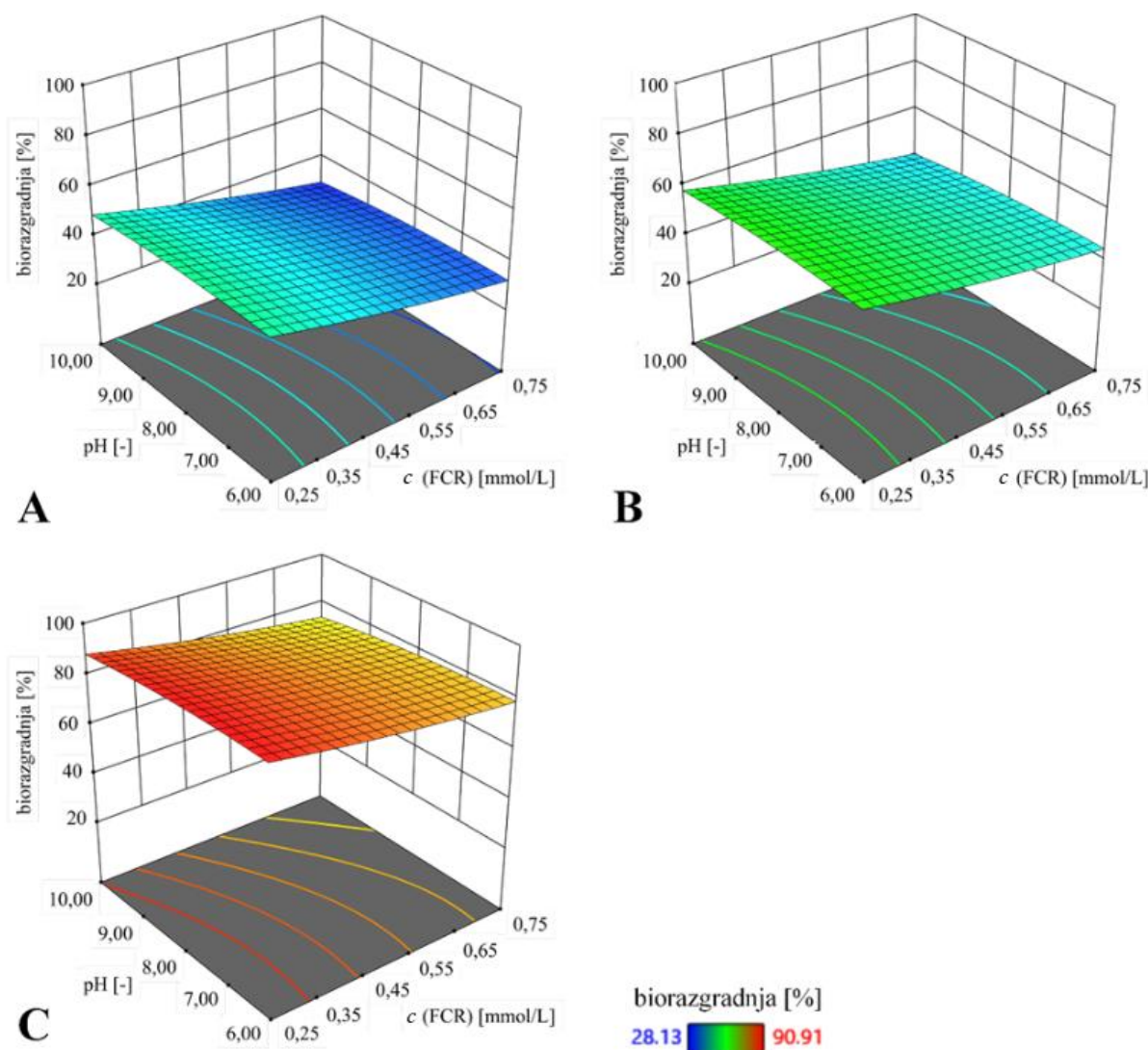
Slika 55 prikazuje odzivne površine modela pri konstantnoj pH vrijednosti, uz variranje optičke gustoće i koncentracije smjese fenola, cijanida i tiocijanata. Analiza je provedena na tri razine pH: 6 (A), 8 (B) i 10 (B).



Slika 55 Odzivne površine modela pri konstantnoj pH vrijednosti 6 (A), 8 (B) i 10 (C), uz variranje optičke gustoće (OG) i koncentracije smjese fenola, cijanida i tiocijanata ($c(\text{FCR})$)

U svim prikazima jasno je izražen trend povećanja postotka biorazgradnje s porastom optičke gustoće mikroalge *Chlorella* sp., što potvrđuje važnost početne biomase u inicijaciji i održavanju biološke razgradnje. Paralelno, opaža se i smanjenje učinkovitosti biorazgradnje s povećanjem koncentracije onečišćujuće smjese, što ukazuje na toksični učinak viših koncentracija fenola, cijanida i tiocijanata na mikroalgu. Navedeni trendovi prisutni su pri svim analiziranim pH vrijednostima, što potvrđuje da su optička gustoća i koncentracija smjese ključni čimbenici u sustavu, dok pH ima sekundarni utjecaj na učinkovitost procesa u promatranom rasponu.

Slika 56 prikazuje odzivne površine modela pri konstantnoj optičkoj gustoći, uz variranje pH vrijednosti i koncentracije smjese fenola, cijanida i tiocijanata. Analiza je provedena na tri razine optičke gustoće: 0,10 (A), 0,50 (B) i 1,00 (C).

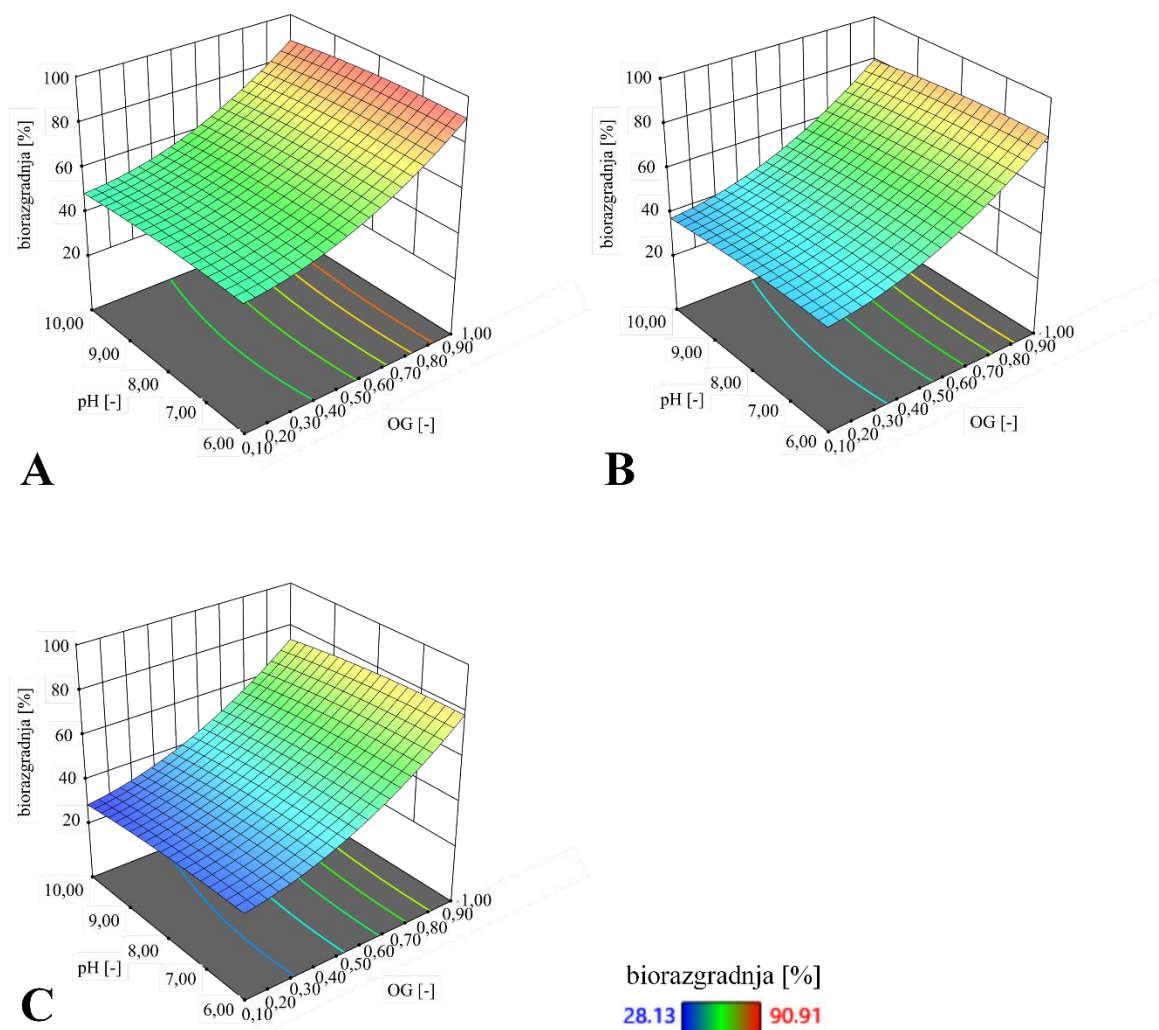


Slika 56 Odzivne površine modela pri konstantnoj optičkoj gustoći (OG) 0,10 (A), 0,50 (B) i 1,00 (C), uz variranje pH i koncentracije smjese fenola, cijanida i tiocijanata ($c(\text{FCR})$)

Uočljive su izražene razlike u učinkovitosti biorazgradnje između promatranih razina optičke gustoće. U svim prikazima zabilježena je veća učinkovitost biorazgradnje pri nižim koncentracijama smjese fenola, cijanida i tiocijanata, dok promjene pH vrijednosti nisu imale značajan utjecaj na odziv. Najniža učinkovitost biorazgradnje zabilježena je pri optičkoj gustoći 0,10, a najviša pri optičkoj gustoći 1,00. Ovi rezultati potvrđuju da je optička gustoća ključan

čimbenik u sustavu te da povećanje početne biomase *Chlorella* sp. pozitivno korelira s kapacitetom biorazgradnje mikroalge.

Slika 57 prikazuje odzivne površine modela pri konstantnoj početnoj koncentraciji smjese fenola, cijanida i tiocijanata, uz variranje pH vrijednosti i optičke gustoće. Analiza je provedena na tri razine koncentracije smjese: 0,25 mmol/L (A), 0,50 mmol/L (B) i 0,75 mmol/L (C).



Slika 57 Odzivne površine modela pri konstantnoj koncentraciji smjese fenola, cijanida i tiocijanata ($c(\text{FCR})$) 0,25 mmol/L (A), 0,50 mmol/L (B) i 0,75 mmol/L (C), uz variranje pH i optičke gustoće (OG)

Kao i u prethodnim analizama, pH nije pokazao značajan utjecaj na učinkovitost procesa biorazgradnje. S druge strane, poboljšanje učinkovitosti biorazgradnje vidljivo je povezano s porastom optičke gustoće. Najviša učinkovitost biorazgradnje postignuta je pri najnižoj

ispitanoj koncentraciji smjese, dok je pri 0,75 mmol/L zabilježen najmanji stupanj biorazgradnje. Ovaj trend podudara se s poznatim mehanizmima kompetitivne inhibicije koji se javljaju u višekomponentnim smjesama toksičnih tvari. Povećane koncentracije pojedinih onečišćivala u smjesi mogu dovesti do međusobne interferencije pri enzimskom vezivanju i nastanka toksičnih međuprodukata, čime se smanjuje ukupna učinkovitost biološke razgradnje. Prema odabranom kvadratnom modelu, maksimalna predviđena učinkovitost biorazgradnje iznosi 90,95 % pri sljedećim optimalnim uvjetima: početna koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata 0,25 mM, optička gustoća mikroalge 1,0 te pH vrijednost 7,328. Ovi uvjeti predstavljaju kompromis unutar eksperimentalnog prostora koji omogućuje uravnoteženu razgradnju svih komponenti smjese. Najbliži ispitani eksperimentalni uvjeti modelu optimizacije zabilježeni su u uzorku T21 (početna koncentracija smjese 0,25 mmol/L, optička gustoća 1,0 i pH 8,0). U tom uzorku postignut je i najveći izmjereni postotak ukupne biorazgradnje, i to 90,91 %, što potvrđuje visoku točnost prediktivnog modela i njegovu primjenjivost u realnim eksperimentalnim uvjetima.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog doktorskog rada procijenjena je ekotoksičnost fenola, cijanida i tiocijanata te njihovih binarnih i ternarnih smjesa, čija je prisutnost u okolišu posljedica ispuštanja nedovoljno obrađenih otpadnih voda industrija poput koksne, kemijske i rudarske. Nadalje, ispitana je mogućnost biorazgradnje smjese ovih spojeva te su određeni optimalni uvjeti za njihovu razgradnju.

Ekotoksičnost otpadnih voda predstavlja važan aspekt u procjeni njihovog utjecaja na okoliš, a Europska komisija i USEPA preporučuju primjenu više testnih organizama iz različitih trofičkih razina u ukupnoj procjeni toksičnosti. Shodno tome, za procjenu toksičnosti fenola, cijanida i tiocijanata primijenjeno je pet testova toksičnosti i to test inhibicije luminiscencije s bakterijom *Aliivibrio fischeri*, test inhibicije rasta s bakterijom *Pseudomonas putida*, test inhibicije rasta s mikroalgom *Chlorella* sp., test inhibicije rasta s vodenom lećom *Lemna minor* i test klijavosti sa sjemenkama luka *Allium cepa*. Međutim, istovremeno prisustvo fenola, cijanida i tiocijanata u otpadnoj vodi zahtijeva i procjenu ekotoksičnosti njihovih binarnih i ternarnih smjesa, što je izvedeno pomoću testa inhibicije luminiscencije s bakterijom *Aliivibrio fischeri*. Osim toga, razvijeni su matematički modeli koji su omogućili predikciju ukupne toksičnosti smjesa zbog mogućih sinergijskih, aditivnih ili antagonističkih međusobnih učinaka komponenata smjese. Nadalje, potencijal biorazgradnje smjese fenola, cijanida i tiocijanata ispitan je pomoću bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. i njihove mješovite kulture u svrhu razumijevanja potencijala mikrobne razgradnje te posljedično razvoja učinkovitih bioremedijacijskih strategija. Dodatno, primijenjeno je i statističko modeliranje za optimizaciju uvjeta biorazgradnje. Po završetku pokusa biorazgradnje, ispitana je toksičnost smjesa na *Aliivibrio fischeri* kako bi se utvrdila učinkovitost detoksikacije smjese.

Rezultati testova toksičnosti pokazali su izražene razlike u osjetljivosti organizama. Najosjetljivijim se pokazao *Aliivibrio fischeri*, dok je cijanid bio najučinkovitiji inhibitor u gotovo svim sustavima. Fenol i tiocijanat također su pokazali toksične učinke, no pri višim koncentracijama i s izraženom vremenskom ovisnošću. *Pseudomonas putida* pokazala je otpornost na fenol, dok je *Chlorella* sp. bila izrazito osjetljiva na cijanid i u manjoj mjeri na tiocijanat. Kod viših biljaka, *Lemna minor* i *Allium cepa*, cijanid je izazvao najizraženije toksične učinke, dok su fenol i tiocijanat pokazali selektivno djelovanje ovisno o parametrima.

Dodatnu vrijednost istraživanju daje matematičko modeliranje toksičnosti smjesa, koje je omogućilo identifikaciju interakcijskih obrazaca među komponentama. Tako je, primjerice, kod smjese fenola i tiocijanata utvrđen izražen sinergizam, dok je smjesa cijanida i tiocijanata pokazala učinke u skladu s modelom aditivnosti. U ternarnim smjesama dominaciju je zadržao cijanid, ali su udjeli fenola doveli do odstupanja ispod ravnine aditivnosti, što ukazuje na kompleksnu prirodu međudjelovanja. Ovi nalazi naglašavaju važnost uključivanja kvantitativne analize smjesa u procjene rizika, budući da agregatna toksičnost može značajno odstupati od predviđene temeljem pojedinačnih komponenti.

U svrhu optimizacije biorazgradnje, provedeni su preliminarni pokusi u kojima su ispitane sposobnosti bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella sp.* te njihove mješovite kulture da koriste smjesu fenola, cijanida i tiocijanata kao izvor ugljika i energije. Ovi pokusi omogućili su identifikaciju mikroalge *Chlorella sp.* kao najperspektivnijeg organizma za glavni pokus biorazgradnje, zahvaljujući njenoj sposobnosti prilagodbe i učinkovitijeg uklanjanja toksičnih tvari, osobito pri nižim koncentracijama smjese. U glavnom pokusu primijenjena je metodologija odzivne površine (RSM) za optimizaciju ključnih parametara: početne koncentracije smjese, optičke gustoće mikroalge te pH vrijednosti. Statističkom analizom potvrđeno je da su koncentracija onečišćujućih tvari i početna biomasa glavni čimbenici koji značajno utječu na učinkovitost procesa, dok pH nije pokazao statistički značajan učinak unutar promatranog raspona. Maksimalna predviđena učinkovitost biorazgradnje iznosila je 90,95 % pri optimalnim uvjetima (početna koncentracija smjese fenola, cijanida i tiocijanata 0,25 mmol/L, optička gustoća suspenzije mikroalge 1,0 te pH 7,328), a eksperimentalno je potvrđena uzorkom T21 (početna koncentracija smjese 0,25 mmol/L, optička gustoća suspenzije mikroalge 1,0 i pH 8,0). Fenol je u svim slučajevima u potpunosti uklonjen iz otopine, dok su cijanid i tiocijanat pokazali znatno veću postojanost.

Kako bi se procijenio stvarni okolišni učinak provedenog procesa, nakon biorazgradnje provedena je ponovna procjena toksičnosti filtrata. Dobiveni rezultati pokazali su da visoka učinkovitost uklanjanja tvari ne jamči i smanjenje ukupne toksičnosti. U nekim je uzorcima, unatoč visokoj stopi biorazgradnje, zabilježena povišena toksičnost. Ova pojava ukazuje na mogućnost stvaranja toksičnih razgradnih produkata, čime se potvrđuje važnost sveobuhvatnog pristupa koji uključuje procjenu toksičnosti i prije i nakon tretmana.

Znanstveni doprinos ovog rada ogleda se u sustavnoj analizi toksičnih učinaka pojedinačnih i kombiniranih organsko-anorganskih onečišćujućih tvari na više trofičkih razina, razvoju i

primjeni modela za kvantitativnu analizu interakcija u smjesama, te optimizaciji parametara biorazgradnje pomoću statističkog modeliranja. Osim toga, rad ukazuje na nužnost praćenja ne samo učinkovitosti uklanjanja tvari, već i njihove rezidualne toksičnosti, kako bi se detoksikacija okoliša mogla procijeniti realno i sveobuhvatno.

Buduća istraživanja trebala bi biti usmjerena na identifikaciju i kvantifikaciju razgradnih produkata, kao i na proširenje testne baterije organizama kako bi se dodatno potvrdila biološka sigurnost obrađenih otpadnih voda. Nadalje, istraživanje sinergijskih učinaka u kompleksnijim, višekomponentnim matricama i primjena ovih spoznaja u pilot- ili realnim industrijskim uvjetima predstavlja logičan nastavak ovog rada.

6. LITERATURA

- [1] Chatterjee S, Das M. Bioremoval of phenol using immobilized cells of *B. pumilus* under batch and recycling condition and analysis of the biodegraded product. *J Biotechnol Biochem* 2020; 6: 33-38.
- [2] AbdelMageed MF, ElRakaiby MT. Algal-bacterial bioremediation of cyanide-containing wastewater in a continuous stirred photobioreactor. *World J Microbiol Biotechnol* 2025; 41: 26.
- [3] Vidal-Tovar C, Cadavid-Osorio C, Correa-Turizo R, Severiche-Sierra C, Cabrera-Lafaurie W. Degradation of cyanides in wastewater from gold mining: a review of literature. *J Eng Appl Sci* 2019; 14: 1475-1485.
- [4] Wang L, An X, Xiao X, Li N, Xie D, Lai F, Zhang Q. Treatment of thiocyanate-containing wastewater: a critical review of thiocyanate destruction in industrial effluents. *World J Microbiol Biotechnol* 2023; 39: 35.
- [5] Gibson DT. Microbial degradation of aromatic compounds. *Science* 1968; 161: 1093-1097.
- [6] Filipowicz N, Momotko M, Boczkaj G, Pawlikowski T, Wanarska M, Cieśliński H. Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water Air Soil Pollut* 2017; 228: 210.
- [7] Pinasseau A, Zerger B, Roth J, Canova M, Roudier S. Best Available Techniques (BAT) Reference Document For Waste Treatment. *Industrial Emissions Directive 2010/75/EU (Integrated Pollution Prevention and Control)* EUR 29362 EN; Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018; ISBN 978-92-79-94038-5.
- [8] Zhao JL, Jiang YX, Yan B, Wei C, Zhang LJ, Ying GG. Multispecies acute toxicity evaluation of wastewaters from different treatment stages in a coking wastewater-treatment plant. *Environ Toxicol Chem* 2014; 33: 1967-1975.
- [9] Tutić A, Miloloža M, Cvetnić M, Martinjak V, Furač L, Markić M, Ukić Š, Bolanča T, Kučić Grgić D. An overview of coking wastewater characteristics and treatment technologies. *Kem Ind* 2023; 72: 349-358.
- [10] Tutić A, Miloloža M, Cvetnić M, Ukić Š, Kučić Grgić D. Phenol, cyanide, and thiocyanate in aquatic media: the ecotoxicity of individual substances and their mixtures. *Environments* 2025; 12: 128.
- [11] Singh N, Balomajumder C. Biodegradation of phenol and cyanide by *Pseudomonas putida* MTCC 1194: an experimental and modeling study. *Desalination Water Treat* 2016; 57: 28426-28435.
- [12] Kim YM. Acclimatization of communities of ammonia oxidizing bacteria to seasonal changes in optimal conditions in a coke wastewater treatment plant. *Bioresour Technol* 2013; 147: 627-631.

- [13] Papadimitriou CA, Samaras P, Sakellariopoulos GP. Comparative study of phenol and cyanide containing wastewater in CSTR and SBR activated sludge reactors. *Bioresour Technol* 2009; 100: 31-37.
- [14] Maraňón E, Vázquez I, Rodríguez J, Castrillón L, Fernández Y. Coke wastewater treatment by a three-step activated sludge system. *Water Air Soil Pollut* 2008; 192: 155-164.
- [15] Melcer H, Nutt SG. Nitrogen control of complex industrial wastewaters. *J Environ Eng* 1988; 114: 166-178.
- [16] Barton PJ, Hammer CA, Kennedy DC. Analysis of cyanides in coke plant wastewater effluents. *J Water Pollut Control Fed* 1978; 50: 234-239.
- [17] Maharana J, Pandey S, Dhal NK. A brief overview of the degradation of cyanides and phenols in the environment with reference to the coke oven industry discharge. *Geomicrobiol J* 2022; 39: 619-630.
- [18] Sarwade VD, Gawai KR. Biodegradation of phenol by alkaliphilic *Bacillus badius* D1. *J Environ Sci Toxicol Food Technol* 2014; 8: 28-35.
- [19] Duan W, Meng F, Cui H, Lin Y, Wang G, Wu J. Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018; 157: 441-456.
- [20] Panigrahy N, Priyadarshini A, Sahoo MM, Verma AK, Daverey A, Sahoo NK. A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. *Environ Technol Innov* 2022; 27: 102423.
- [21] Ministarstvo zaštite okoliša i energetike. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. NN 26/20.
- [22] Schwarzbauer J. Organic matter in the hydrosphere. U Wilkes H (ur). *Hydrocarbons, oils and lipids: diversity, origin, chemistry and fate*. Springer 2020; 1-23.
- [23] Michałowicz J, Duda ROW. Analysis of chlorophenols, chlorocatechols, chlorinated methoxyphenols and monoterpenes in communal sewage of ŁÓDŹ and in the Ner river in 1999-2000. *Water Air Soil Pollut* 2005; 164: 205-222.
- [24] Bezverbna O, Załęska-Radziwiłł M. Ecotoxicological evaluation the effects of the safe concentration of wastewater containing phenol on aquatic ecosystems. *J Environ Eng Landsc Manag* 2018; 26: 57-63.
- [25] Duan W, Meng F, Lin Y, Wang G. Toxicological effects of phenol on four marine microalgae. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017; 52: 170-176.
- [26] Moradkhani M, Yaghmaei S, Ghobadi Nejad Z. Biodegradation of cyanide under alkaline conditions by a strain of *Pseudomonas putida* isolated from gold mine soil and optimization of process variables through response surface methodology (RSM). *Period Polytech Chem Eng* 2017; 62: 265-273.

- [27] Anand V, Pandey A. Role of microbes in biodegradation of cyanide and its metal complexes. In: *Development in Wastewater Treatment Research and Processes*. Elsevier, pp. 205-224.
- [28] Alvillo-Rivera A, Garrido-Hoyos S, Buitrón G, Thangarasu-Sarasvathi P, Rosano-Ortega G. Biological treatment for the degradation of cyanide: A review. *J Mater Res Technol* 2021; 12: 1418-1433.
- [29] Alvillo-Rivera AJ, Garrido-Hoyos SE, Rosano-Ortega G. Optimization of factors for the biological treatment of free and complexed cyanide. *Processes* 2023; 11: 2063.
- [30] Vedula RK, Dalal S, Majumder CB. Bioremoval of cyanide and phenol from industrial wastewater: An update. *Bioremediation J* 2013; 17: 278-293.
- [31] Li L, Yue F, Li Y, Yang A, Li J, Lv Y, Zhong X. Degradation pathway and microbial mechanism of high-concentration thiocyanate in gold mine tailings wastewater. *RSC Adv* 2020; 10: 25679-25684.
- [32] Europska komisija. Provedbena odluka komisije od 28. veljače 2012. o donošenju zaključaka o najboljim raspoloživim tehnikama (NRT) u okviru Direktive 2010/75/EU Europskog parlamenta i Vijeća o industrijskim emisijama za proizvodnju željeza i čelika. *Službeni list Europske unije* 2012/135/EU.
- [33] Kurashova I, Halevy I, Kamyshny A. Kinetics of decomposition of thiocyanate in natural aquatic systems. *Environ Sci Technol* 2018; 52: 1234-1243.
- [34] Paruchuri YL, Shivaraman N, Kumaran P. Microbial transformation of thiocyanate. *Environ Pollut* 1990; 68: 15-28.
- [35] Plavšić F, Lovrić Z, Wolf Čoporda A, Ježić Vidović IZ, Čepelak Dodig D, Gretić D, Đurašević S, Gašpar J, Knepr Šegina M, Đuzel M, Lambert T. Siguran rad s kemikalijama. Zagreb 2025.
- [36] Park JS, Brown MT, Han T. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata*. *Aquat Toxicol Amst Neth* 2012; 106-107: 182-188.
- [37] Aruoja V, Sihtmäe M, Dubourguier HC, 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.
- [38] HRN EN ISO 11348-3:2010, Kvaliteta vode – Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) – 3. dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju liofilizirane bakterije.
- [39] URL: <https://www.sciencephoto.com/media/873912/view/vibrio-fischeri-symbiotic-bacterium-sem> (pristup 11. lipnja 2025).
- [40] Marugán J, Bru D, Pablos C, Catalá M. Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. *J Hazard Mater* 2012; 213-214: 117-122.

- [41] Ghosh SK, Doctor PB. Toxicity screening of phenol using microtox. *Environ Toxicol Water Qual* 1992; 7: 157-163.
- [42] Abbondanzi F, Cachada A, Campisi T, Guerra R, Raccagni M, Iacondini A. Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox® assay. *Chemosphere* 2003; 53: 889-897.
- [43] International-Standard (ISO 10712), Water quality — *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test), 1995.
- [44] URL: <https://www.sciencephoto.com/search?q=pseudomonas+putida> (pristup 7. srpnja 2025).
- [45] Nakazawa T. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* 2002; 4: 782-786.
- [46] 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: 299-323.
- [47] Sieuwerts S, de Bok F a. M, Mols E, De Wos VM, Van Hylckama Vlieg JET. A simple and fast method for determining colony forming units. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47: 275-278.
- [48] Slabbert JL. Development of guidelines for toxicity bioassaying of drinking and environmental waters in South Africa. Pretoria: Water Research Commission, 1998.
- [49] Wu HL, Hseu RS, Lin LP. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Bot Bull Acad Sin* 2001; 42: 115-121.
- [50] Li Y, Chen YF, Chen P, Min M, Zhou W, Martinez B, Zhu J, Ruan R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Biores Technol* 2011; 102: 5138-5144.
- [51] URL: <https://www.sciencephoto.com/media/412122/view/microalgae-biofuel-research> (pristup 7. srpnja 2025).
- [52] OECD, Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2011.
- [53] Nyholm N, Källqvist T. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ Toxicol Chem* 1989; 8: 689-703.
- [54] Ensley HE, Sharma HA, Barber JT, Polito MA. Metabolism of chlorinated phenols by *Lemna gibba*, duckweed. U Kruger EL, Anderson TA, Coats JR (ur.). Phytoremediation of soil and water contaminants. American Chemical Society, Washington DC 1997; 238-253.
- [55] URL: <https://www.sciencephoto.com/search?q=lemna+minor> (pristup 7. srpnja 2025).
- [56] OECD. Test No. 221: *Lemna* sp. growth inhibition test. OECD Publishing, Paris, 2006.

- [57] Vuković S, Indić D, Gvozdenac S. Phytotoxic effects of fungicides, insecticides and nonpesticidal components on pepper depending on water quality. *Pestic Phytomed* 2014; 29: 145-153.
- [58] Bažok R, Cenko P. Phytotoxicity of the combination of some insecticides and fungicides on the ornamental species *Petunia* sp. *Poljoprivreda* 2016; 22: 35-39.
- [59] OECD, Test No. 208: Terrestrial Plant Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2006.
- [60] Mendes PM, Ribeiro JA, Martins GA, Lucia T, Araujo TR, Fuentes-Guevara MD, Corrêa LB, Corrêa EK. Phytotoxicity test in check: Proposition of methodology for comparison of different method adaptations usually used worldwide. *J Environ Manage* 2021; 291: 112698.
- [61] Fiskesjö G. The allium test in wastewater monitoring. *Environ Toxicol Water Qual* 1993; 8: 291-298.
- [62] Bruce RM, Santodonato J, Neal MW. Summary review of the health effects associated with phenol. *Toxicol Ind Health* 1987; 3: 535-568.
- [63] Cho K, Lee CH, Ko K, Lee YJ, Kim KN, Kim MK, Chung YH, Kim D, Yeo IK, Oda T. Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Algal Res* 2016; 17: 61-66.
- [64] Downs JW, Wills BK. Phenol Toxicity. StatPearls Publishing, 2025.
- [65] Tomei MC, Mosca Angelucci D, Clagnan E, Brusetti L. Anaerobic biodegradation of phenol in wastewater treatment: achievements and limits. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021; 105: 2195-2224.
- [66] Scragg AH. The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39: 796-799.
- [67] Shigeoka T, Sato Y, Takeda Y, Yoshida K, Yamauchi F. Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure-activity relationships. *Environ Toxicol Chem* 1988; 7: 847-854.
- [68] Gaur V, Mathur A. Determination of LC₅₀ of phenolic compounds (phenol & m-cresol) for a fish, *Labeo rohita*. *Int J Med Lab Res* 2019; 04: 55-63.
- [69] López-Ramírez V, Márquez Godoy MA, Moreno Herrera CX. Characterization of bacterial diversity and assessing the cyanide biodegradation potential of bacterial isolates from gold processing plants. *DYNA* 2021; 88: 136-144.
- [70] Liu Q, Zhang G, Ding J, Zou H, Shi H, Huang C. Evaluation of the removal of potassium cyanide and its toxicity in green algae (*Chlorella vulgaris*). *Bull Environ Contam Toxicol* 2018; 100: 228-233.

- [71] Tez S, Oral R, Koçbaş F, Koru E, Türkçü N, Pagano G, Trifuoggi M. Comparative multi-species analysis of potassium cyanide toxicity. *Mar Pollut Bull* 2022; 182: 113965.
- [72] Ryu BG, Kim W, Nam K, Kim S, Lee B, Park MS. A comprehensive study on algal-bacterial communities shift during thiocyanate degradation in a microalga-mediated process. *Bioresour Technol* 2015; 191: 496-504.
- [73] Heming TA, Thurston RV, Meyn EL, Zajdel RK. Acute toxicity of thiocyanate to trout. *Trans Am Fish Soc* 1985; 114: 895-905.
- [74] Watson SJ, Maly EJ. Thiocyanate toxicity to *Daphnia magna*: modified by pH and temperature. *Aquat Toxicol* 1987; 10: 1-8.
- [75] Lanno RP, Dixon DG. The comparative chronic toxicity of thiocyanate and cyanide to rainbow trout. *Aquat Toxicol* 1996; 36: 177-187.
- [76] Sigurnjak Bureš M, Ukić Š, Cvetnić M, Prevarić V, Markić M, Rogošić M, Kušić H, Bolanča T. Toxicity of binary mixtures of pesticides and pharmaceuticals toward *Vibrio fischeri*: Assessment by quantitative structure-activity relationships. *Environ Pollut* 2021; 275: 115885.
- [77] Sigurnjak Bureš M. Modeliranje toksičnosti višekomponentnih otopina farmaceutika i pesticida. *Doktorski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu 2021.
- [78] Loewe S, Muischnek H. Über Kombinationswirkungen. I. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1926; 114: 313-326.
- [79] Wen Y, Li C, Song X, Yang Y. Biodegradation of phenol by *Rhodococcus* sp. strain SKC: Characterization and kinetics study. *Molecules* 2020; 25: 3665.
- [80] URL: <https://homework.study.com/explanation/describe-the-phases-of-the-bacterial-growth-curve.html> (pristup 7. srpnja 2025)
- [81] Knight KL. Study/Experimental/Research Design: Much more than statistics. *J Athl Train* 2010; 45: 98-100.
- [82] Pereira LMS, Milan TM, Tapia-Blácido DR. Using response surface methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. *Biomass Bioenergy* 2021; 151: 106166.
- [83] Agneta M, Zhaomin L, Chao Z, Gerald G. Investigating synergism and antagonism of binary mixed surfactants for foam efficiency optimization in high salinity. *J Pet Sci Eng* 2019; 175: 489-494.
- [84] Hasan SA, Jabeen S. Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2015; 29: 45-53.
- [85] Goudar CT, Ganji SH, Pujar BG, Strevett A. Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Water Environ Res* 2000; 72: 50-55.

- [86] Arutchelvan V, Kanakasabai V, Elangovan R, Nagarajan S, Muralikrishnan V. Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. *J Hazard Mater* 2006; 129: 216-222.
- [87] Hussain A, Dubey SK, Kumar V. Kinetic study for aerobic treatment of phenolic wastewater. *Water Resour Ind* 2015; 11: 81-90.
- [88] Liu Z, Xie W, Li D, Peng Y, Li Z, Liu S. Biodegradation of phenol by bacteria strain *Acinetobacter Calcoaceticus* PA isolated from phenolic wastewater. *Int J Environ Res Public Health* 2016; 13: 300.
- [89] Aisami A, Yasid N, Shukor M. Optimization of cultural and physical parameters for phenol biodegradation by newly identified *Pseudomonas* sp. AQ5-04. *J Trop Life Sci* 2020; 10: 223-233.
- [90] Suhaila Y, Hasdianty A, Maegala NM, Aqlima A, Hazwan AH, Rosfarizan M, Ariff AB. Biotransformation using resting cells of *Rhodococcus* UKMP-5M for phenol degradation. *Biocatal Agric Biotechnol* 2019; 21: 101309.
- [91] Di Caprio F, Scarponi P, Altimari P, Iaquaniello G, Pagnanelli F. The influence of phenols extracted from olive mill wastewater on the heterotrophic and mixotrophic growth of *Scenedesmus* sp. *J Chem Technol Biotechnol* 2018; 93: 3619-3626.
- [92] Wang L, Xue C, Wang L, Zhao Q, Wei W, Sun Y. Strain improvement of *Chlorella* sp. for phenol biodegradation by adaptive laboratory evolution. *Bioresour Technol* 2016; 205: 264-268.
- [93] Surkatti R, Al-Zuhair S. Microalgae cultivation for phenolic compounds removal. *Environ Sci Pollut Res* 2018; 25: 33936-33956.
- [94] Lindner AV, Pleissner D. Utilization of phenolic compounds by microalgae. *Algal Res* 2019; 42: 101602.
- [95] Pinto G, Pollio A, Previtera L, Stanzione M, Temussi F. Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1657-1659.
- [96] Yan J, Jianping W, Hongmei L, Suliang Y, Zongding H. The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J* 2005; 24: 243-247.
- [97] Liu H, Yu QJ, Wang G, Ye F, Cong Y. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1. *Process Biochem* 2011; 46: 1678-1681.
- [98] Ibrahim AG, Al-Ghamdi LS. Bioremediation of phenol by mutated and immobilized *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Not Sci Biol* 2019; 11: 410-416.
- [99] Bernats M, Juhna T. Removal of phenols-like substances in pharmaceutical wastewater with fungal bioreactors by adding *Trametes versicolor*. *Water Sci Technol* 2018; 78: 743-750.

- [100] Shahryari S, Zahiri HS, Haghbeen K, Adrian L, Noghabi KA. High phenol degradation capacity of a newly characterized *Acinetobacter* sp. SA01: Bacterial cell viability and membrane impairment in respect to the phenol toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018; 164: 455-466.
- [101] Das SK, Sathish A, Stanley J. Production of biofuel and bioplastic from *Chlorella Pyrenoidosa*. *Mater Today Proc* 2018; 5: 16774-16781.
- [102] Botz MM, Mudder TI, Akcil AU. Cyanide treatment: Physical, chemical and biological processes. U Advances in gold ore processing. Elsevier, 2013; 672-702.
- [103] Khamar Z, Makhdoumi-Kakhki A, Mahmudy Gharaie MH. Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *Int Biodeterior Biodegrad* 2015; 99: 123-128.
- [104] Karamba KI, Syed MA, Shukor MY, Ahmad SA. Effect of heavy metals on cyanide biodegradation by resting cells of *Serratia marcescens* strain AQ07. *J Environ Microbiol Toxicol* 2014; 2: 58-60.
- [105] Akinpelu EA, Ntwampe SK, Mpongwana N, Nchu F, Ojumu TV. Biodegradation kinetics of free cyanide in *Fusarium oxysporum*-*Beta vulgaris* waste-metal (As, Cu, Fe, Pb, Zn) cultures under alkaline conditions. *BioResources* 2016; 11: 2470-2482.
- [106] Dwivedi N, Dwivedi S. Sustainable biological approach for removal of cyanide from wastewater of a metal-finishing industry. U Shah MP, Rodriguez-Couto S (ur.) Membrane-based hybrid processes for wastewater treatment. Elsevier, 2021; 463-479.
- [107] Mekuto L, Alegbeleye OO, Ntwampe SKO, Ngongang MM, Mudumbi JB, Akinpelu EA. Co-metabolism of thiocyanate and free cyanide by *Exiguobacterium acetylicum* and *Bacillus marisflavi* under alkaline conditions. *3 Biotech* 2016; 6: 173.
- [108] Ojaghi A, Shafaie Tonkaboni SZ, Shariati P, Ardejani FD. Novel cyanide electro-biodegradation using *Bacillus pumilus* ATCC 7061 in aqueous solution. *J Environ Health Sci Eng* 2018; 16: 99-108.
- [109] Mirizadeh S, Yaghmaei S, Ghobadi Nejad Z. Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *J Environ Health Sci Eng* 2014; 12: 85.
- [110] Cabuk A, Unal AT, Kolankaya N. Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 1313-1317.
- [111] Xiao X, An X, Jiang Y, Wang L, Li Z, Lai F, Zhang Q. A newly developed consortium with a highly efficient thiocyanate degradation capacity: A comprehensive investigation of the degradation and detoxification potential. *Environ Pollut* 2023; 318: 120878.
- [112] Tomar SK, Chakraborty S. Effect of air flow rate on development of aerobic granules, biomass activity and nitrification efficiency for treating phenol, thiocyanate and ammonium. *J Environ Manage* 2018; 219: 178-188.

- [113] Raper E, Stephenson T, Fisher R, Anderson DR, Soares A. Characterisation of thiocyanate degradation in a mixed culture activated sludge process treating coke wastewater. *Bioresour Technol* 2019; 288: 121524.
- [114] Kwon HK, Woo SH, Park JM. Thiocyanate degradation by *Acremonium strictum* and inhibition by secondary toxicants. *Biotechnol Lett* 2002; 24: 1347-1351.
- [115] Botz MM, Mudder TI, Akcil AU. Cyanide treatment: Physical, chemical and biological processes. U Advances in gold ore processing. Elsevier, 2013; 672-702.
- [116] Pan J, Ma J, Wu H, Ren Y, Fu B, He M, Zhu S, Wei C. Simultaneous removal of thiocyanate and nitrogen from wastewater by autotrophic denitrification process. *Bioresour Technol* 2018; 267: 30-37.
- [117] Huang H, Feng C, Pan X, Wu H, Ren Y, Wu C, Wei C. Thiocyanate oxidation by coculture from a coke wastewater treatment plant. *J Biomater Nanobiotechnology* 2013; 04: 37-46.
- [118] Chaudhari AU, Kodam KM. Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85: 1167-1174.
- [119] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/996> (pristup 14. lipnja 2025).
- [120] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9032> (pristup 14. lipnja 2025).
- [121] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/516872> (pristup 14. lipnja 2025).
- [122] Kalčíková G, Skalar T, Marolt G, Kokalj AJ. An environmental concentration of aged microplastics with adsorbed silver significantly affects aquatic organisms. *Water Res* 2020; 175: 115644.
- [123] Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 1987; 148: 350-382.
- [124] Combarros R, Collado S, Laca A, Diaz M. Conditions and mechanisms in thiocyanate biodegradation. *J Residuals Sci Technol* 2015; 12: 113-124.
- [125] Medić AB, Karadžić IM. *Pseudomonas* in environmental bioremediation of hydrocarbons and phenolic compounds- key catabolic degradation enzymes and new analytical platforms for comprehensive investigation. *World J Microbiol Biotechnol* 2022; 38: 165.
- [126] Hill GA, Robinson CW. Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng* 1975; 17: 1599-1615.
- [127] Keweloh H, Heipieper HJ, Rehm HJ. Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 31: 383-389.
- [128] Santos PM, Benndorf D, Sá-Correia I. Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 2640-2652.

- [129] Zhou L, Yuan Y, Li X, Mei S, Gao J, Zhao Q, Wei W, Sun Y. Exploration of phenol tolerance mechanism through antioxidative responses of an evolved strain, *Chlorella* sp. L5. *J Appl Phycol* 2018; 30: 2379-2385.
- [130] Jaimes Prada O, Diaz OL, Tache Rocha K. Lenteja de agua (*Lemna minor*): potencial alimentario y ambiental. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 2024; 15: 404-424.
- [131] Radulović O, Stanković S, Uzelac B, Tadić V, Trifunović-Momčilov M, Lozo J, Marković M. Phenol removal capacity of the common duckweed (*Lemna minor* L.) and six phenol-resistant bacterial strains from its rhizosphere: In vitro evaluation at high phenol concentrations. *Plants* 2020; 9: 599.
- [132] Ullrich-Eberius CI, Novacky A, Ball E. Effect of cyanide in dark and light on the membrane potential and the ATP level of young and mature green tissues of higher plants. *Plant Physiol* 1983; 72: 7-15.
- [133] Ju HY, Bible BB, Chong C. Influence of ionic thiocyanate on growth of cabbage, bean, and tobacco. *J Chem Ecol* 1983; 9: 1255-1262.
- [134] Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. Plant physiology and development, Sixth Edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 2015.
- [135] Davies H. Biochemistry and molecular biology of plants. *Experimental Agriculture* 2002; 38.
- [136] Dar SA, Wani A, Ganie A, Kandoo AA, Wani MJ. Resistance against insect pests by phenolics and their derivative compounds. *J Crop Weed* 2017; 13: 187-193.
- [137] Ogunyemi AK, Abayomi AA, Opawale RO, Samuel TA, Ilori MO, Amund OO, Alo BI. Alkaline-extracted cyanide from cassava wastewater and its sole induction of chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. root tips. *Environ Technol* 2022; 43: 3097-3106.
- [138] Lerner HR. Introduction to the response of plants to environmental stresses. U Plant Responses to Environmental Stresses. Routledge, 1999.
- [139] Pessarakli M. Handbook of plant and crop stress, Fourth Edition. CRC Press, 2019.
- [140] Song Z, Huang G. Toxic effects of pentachlorophenol on *Lemna polyrhiza*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007; 66: 343-347.
- [141] González PS, Maglione GA, Giordana M, Paisio CE, Talano MA, Agostini E. Evaluation of phenol detoxification by *Brassica napus* hairy roots, using *Allium cepa* test. *Environ Sci Pollut Res Int* 2012; 19: 482-491.
- [142] Levan A, Wangenheim KHFRH. Potassium cyanide in the *Allium* test. *Hereditas* 1952; 38: 297-313.
- [143] Monteiro ÁAMG, Boaventura RAR, Rodrigues AE. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochem Eng J* 2000; 6: 45-49.

- [144] Kundu A, Cherwoo L, Kumar B. Leveraging microorganisms for phenol and cyanide degradation in coke oven industry effluent treatment: Current advances and future potential. *Bioresour Technol Rep* 2023; 23: 101586.
- [145] Tutić A, Vuković-Domanovac M, Kučić-Grgić D, Miloloža M. Biological degradation of cyanide, thiocyanate, and phenolic compounds in wastewater. *Kem Ind* 2025; 74: 219-234.
- [146] Lu BL, Qi L, Li MX. Effects of temperature on the growth and product accumulation of *Chlorella* sp. *Adv Mater Res* 2013; 712-715: 428-432.
- [147] Anand V, Pandey A. Role of microbes in biodegradation of cyanide and its metal complexes. U Rodriguez-Couto S, Shah MP (ur.). *Development in wastewater treatment research and processes*. Elsevier, 2022; 205-224.

POPIS KRATICA

BPK ₅	biokemijska potrošnja kisika
MDK	maksimalna dopuštena koncentracija
PCP	pentaklorofenol
pKa	konstanta disocijacije
KPK	kemijska potrošnja kisika
LC	letalna koncentracija
EC	efektivna koncentracija
SEM	svjetlosni elektronski mikroskop
USEPA	Agencija Sjedinjenih Američkih Država za zaštitu okoliša
FMNH ₂	flavin-mononukleotid
FMN	oksidirani mononukleotid
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
SDS	sindrom iznenadne smrti
CA	model koncentracijske adicije
IA	model neovisnog djelovanja
DOE	planiranje pokusa
RSM	metodologija odzivne površine
FFD	<i>full factorial</i> dizajn
ANOVA	analiza varijance
SD	standardna devijacija
CV	koeficijent varijacije
R ²	koeficijent determinacije
HRT	hidrauličko vrijeme zadržavanja
CAS	karbonilni put razgradnje tiocijanata
CNO	cijanatni put razgradnje tiocijanata
RLU	relativna svjetlosna jedinica
CFU	broj živih stanica
OG	optička gustoća
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IC	ionska kromatografija
ATP	adenozin trifosfat
TU	toksikološki učinak
K	kontrola
SP	slijepa proba
SS	zbroj kvadrata
df	stupnjevi slobode
MS	kvadrat srednje vrijednosti

ŽIVOTOPIS

Ana Tutić, rođena 18. kolovoza 1995. osnovnoškolsko obrazovanje završila je u Osnovnoj školi Antunovac, nakon čega upisuje I. gimnaziju Osijek. Po završetku srednje škole upisuje Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Nakon završetka preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij Procesno inženjerstvo na istom fakultetu. Eksperimentalni dio svog diplomskog rada odrađuje tijekom tromjesečnog boravka u norveškom gradu Trondheimu, na prestižnom Norveškom Sveučilištu Znanosti i Tehnologije, u sklopu Erasmus+ stručne prakse. Diplomira 2019. s temom *Biološko uklanjanje dušika iz komunalne otpadne vode grada Trondheima* što je bio prvi diplomski rad napisan na engleskom jeziku na Sveučilištu. Iste godine zapošljava se na Katedri za ekologiju i toksikologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek kao asistent na kolegijima Tehnologija vode i obrada otpadnih voda, Ekologija te Upravljanje kakvoćom vode i procesi obrade vode. Od 2021. do 2025. radi u privatnom sektoru čija je primarna djelatnost gospodarenje otpadnim vodama u vidu projektiranja, istraživanja i proizvodnje postrojenja za obradu otpadne vode, s naglaskom na industriju. 2021. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Autorica je šest znanstvenih radova, a do sada je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim konferencijama s usmenim ili posterskim priopćenjima. Članica je Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.

Popis radova objavljenih u časopisima:

1. Tutić I, Miloloža M, Cvetnić M, Ukić Š, Kučić-Grgić D. Phenol, cyanide, and thiocyanate in aquatic media: the ecotoxicity of individual substances and their mixtures. *Environments* 12 (4):128 (2025).
2. Tutić A, Vuković-Domanovac M, Kučić-Grgić D, Miloloža M. Biological Degradation of Cyanide, Thiocyanate, and Phenolic Compounds in Wastewater. *Kemija u Industriji* 74 (2025) 219-234.
3. Kristek Janković A, Habuda-Stanić M, Dong H, Tutić A, Romić Ž, Ergović Ravančić M, Landeka Dragičević T, Šiljeg M. Utilization of Modified Sunflower Seed as Novel Adsorbent for Nitrates Removal from Wastewater. *Water*, 16 (2024).

4. Tutić A, Miloloža M, Cvetnić M, Martinjak V, Furač L, Markić M, Ukić Š, Bolanča T, Kučić-Grgić D. An overview of coking wastewater characteristics and treatment technologies. *Kemija u industriji* 72 (2023) 349-358.
5. Habuda-Stanić M, Tutić A, Kučić-Grgić D, Zeko-Pivač A, Burilo A, Paixão S, Teixeira V, Pagaimo M, Pala A, Ergović Ravančić M. Adsorption of humic acid from water using chemically modified bituminous coal-based activated carbons. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 35 (2021) 189-203.
6. Tutić A, Zeko-Pivač A, Landeka Dragičević T, Šiljeg M, Habuda-Stanić M. Uklanjanje i uporaba fosfora iz otpadnih voda. *Hrvatske Vode*, 29 (2021) 33-41.

Popis radova objavljenih u zbornicima radova sa znanstvenih skupova:

1. Vrbić L, Tutić A, Miloloža M, Cvetnić M, Kučić-Grgić D. Bioremediation of water polluted with phenols, cyanides and rhodanides by green microalgae *Chlorella* sp. // 5. Međunarodna ZORH konferencija znanstvenika, stručnih djelatnika i studenata na temu zaštite okoliša u Republici Hrvatskoj, Split, Hrvatska, 09.04.2025–11.04.2025.
2. Kuzmić L, Tutić A, Miloloža M, Kučić-Grgić D. Determination of ecotoxicity of phenol with *Chlorella* sp. and *Pseudomonas putida* // XV Meeting of Young Chemical Engineers : Book of Abstracts / XV. susret mladih kemijskih inženjera : knjiga sažetaka / Ujević Andrijić Ž, Vidak A (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI), 2024. str. 65.
3. Bebek N, Vrbić L, Tutić A, Miloloža M, Kučić-Grgić D. Determination of ecotoxicity of phenols, rhodanides and cyanides // XV Meeting of Young Chemical Engineers : Book of Abstracts / XV. susret mladih kemijskih inženjera : knjiga sažetaka / Ujević Andrijić Ž, Vidak A (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI), 2024. str. 61.
4. Tutić A, Bubaš P, Dragun DD, Kuzmić L, Stanić L, Miloloža M, Cvetnić M, Markić M, Ukić Š, Kučić-Grgić D. Determination of ecotoxicity and phytotoxicity of phenol, rhodanide, and cyanide // 20. Ružičkini dani – Danas znanost, sutra industrija / Jukić A, Očelić Bulatović V, Kučić-Grgić D (ur.). Osijek, Zagreb: HDKI; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2024. str. 126.

5. Tutić A, Prevarić V, Miloloža M, Ukić Š, Kučić-Grgić D, Markić M, Sipos L. Filtration of coking wastewater through granular activated carbon filter seeded with biomass // 19th Ružička Days – Today Science, Tomorrow Industry. Osijek, Zagreb: 2022. str. 151.
6. Tutić A, Kiščinal A, Prevarić V, Miloloža M, Ukić Š, Kučić-Grgić D, Markić M, Sipos L. Coke industry wastewater treatment by combination of biological, chemical and physical processes // 9th International Conference Water for All : Book of Abstracts. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, 2022. str. 90–91.
7. Tutić A, Prevarić V, Miloloža M, Cvetnić M, Ukić Š, Kučić-Grgić D. Pročišćavanje otpadne vode koksne industrije // 6. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 232–233.
8. Tutić A, Miloloža M, Cvetnić M, Prevarić V, Markić M, Ukić Š, Bolanča T, Kučić-Grgić D. Isolation and identification of microorganisms from the real coking wastewater // XIV. susret mladih kemijskih inženjera. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI), 2022. str. 84.
9. Zeko-Pivač A, Tutić A, Landeka Dragičević T, Šiljeg M, Habuda-Stanić M. Phosphate removal from wastewater: an overview // 18th International Conference Ružička Days – Today Science, Tomorrow Industry : Book of Abstracts / Jukić A (ur.). Zagreb, Osijek: HDKI; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020. str. 161.
10. Tutić A, Zeko-Pivač A, Burilo A, Teixeira VS, Pagaimo MO, Paixão S, Habuda-Stanić M. Removal of humic acid from water by adsorption onto modified activated carbon // 18th International Conference Ružička Days – Today Science, Tomorrow Industry : Book of Abstracts / Jukić A (ur.). Zagreb, Osijek: HDKI; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020. str. 159.