

Toksičnost komercijalnih surfaktanata na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Brajak, Vlatka

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:681454>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Vlatka Brajak

Toksičnost komercijalnih surfaktanata
na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad izrađen je na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALA

Diplomski rad izradila sam u Botaničkom Zavodu Biološkog Odsjeka Priridoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Najprije zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Jasni Hrenović na pomoći i stručnom vodstvu, te Miroslavu Horvatićeku s kojim sam radila praktični dio istraživanja.

Veliko hvala mojim roditeljima na potpori i velikom razumijevanju, bratu Igoru na pomoći u Wordu i Excelu i mom malom Marku kojeg volim najviše na svijetu..

Također se zahvaljujem Višnji Kukolj, svojoj nastavnici iz biologije iz moje Osnovne škole koja je pobudila u meni interes i ljubav prema biologiji.

Hvala Maji i Ivani, mojim najboljim prijateljicama već dugi niz godina koje su uvijek bile potpora, od vremena kad je Mili ispitivao biologiju, pa sve do zadnjeg ispita.

Hvala i Nikoli koji je trpio najviše nervoze pred ispite i proživio najveći dio faksa samnom.

I najveće hvala mojim curama sa Save, najviše Olji zbog svega što smo prošle zajedno, Neni na savjetima i podršci, zatim Nikici, Dani, Mari, Aniti, Martini, Fressi i naravno Dariu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

TOKSIČNOST KOMERCIJALNIH SURFAKTANATA NA KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Vlatka Brajak

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek
Roosveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Cilj ovog rada je utvrđivanje toksičnosti komercijalnih surfaktanata kao sastavnog dijela deterdženata, omekšivača rublja i sredstava za čišćenje koji se koriste u domaćinstvima. Ispitano je 15 komercijalnih surfaktanata. Za utvrđivanje toksičnosti korištena su dva testa na kvascu *S. cerevisiae*, fermentacijski test i test metilenskog modrila.

Dobivene su EC_{50} vrijednosti prema kojima su surfaktanti svrstani u tri kategorije štetnosti. Tri ispitana surfaktanta pokazala su se toksičnim s izmjerenim EC_{50} vrijednostima između 1 i 10 mg/L, dok je šest spojeva pokazalo vrlo nisku toksičnost, s izmjerenim EC_{50} vrijednostima znatno iznad 100 mg/L. Ostalih šest uzoraka svrstano je u kategoriju štetnih s izmjerenim EC_{50} vrijednostima između 10 i 100 mg/L. Test metilenskim modrilom na kvascu *S. cerevisiae* pokazao se osjetljivijim od fermentacijskog testa jer je uglavnom davao niže EC_{50} vrijednosti.

(82 stranice, 46 slika, 5 tablica, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: deterdžent, testovi toksičnosti, *S. cerevisiae*, fermentacija, metilensko modrilo, postotak inhibicije, efektivna koncentracija EC_{50} .

Voditelj: doc. dr. sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Jasna Hrenović, dr.sc. Mirjana Kalafatić, red prof., doc. dr. sc. Zoran Tadić, doc. dr. Sc. Sven Jeslaska

Rad prihvaćen: 03.06.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

THE TOXICITY OF COMMERCIAL SURFACTANTS

ON YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

Vlatka Brajak

University of Zagreb, Faculty of Science, Department of Biology,

Roosveltova trg 6, Zagreb

SUMMARY

The goal of this study was to assess toxicity of commercial surfactants as essential parts of detergent, fabric softeners and cleaning products which are used in households.

15 commercial surfactants were analyzed. The toxicity was evaluated by two tests on yeast, *S. cerevisiae*, fermentation test and methylene blue dye test. According to obtained EC_{50} values surfactants were sorted in three categories of adversity. Three tested surfactants were proven toxic with EC_{50} values ranking between 1 and 10 mg/L, while six compounds showed very low level of toxicity with EC_{50} values considerably higher than 100 mg/L. Remaining six samples had been classified as not harmful for the environment, as their EC_{50} values ranked between 10 and 100 mg/L. Methylene blue dye test on yeast *S. cerevisiae* was found to be more sensitive than fermentation test, because the estimated EC_{50} values using methylene blue dye test were mainly lower.

(82 pages, 46 figures, 5 tables, 29 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: detergent, toxicity tests, *S. cerevisiae*, fermentation, methylene blue, inhibition percentage, effective concentration EC_{50} .

Supervisor: doc. dr. sc. Jasna Hrenović

Reviewers: doc. dr. sc. Jasna Hrenović, dr.sc. Mirjana Kalafatić, red prof., doc. dr. sc. Zoran Tadić, doc. dr. sc. Sven Jelaska.

Thesis accepted: 03.06.2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. DETERDŽENTI.....	3
1.2. SURFAKTANTI.....	6
1.2.1. Anionski surfaktanti.....	11
1.2.2. Kationski surfaktanti.....	16
1.2.3. Neionski surfaktanti.....	18
1.2.4. Amfotermni surfaktanti.....	20
1.3. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.4. TESTOVI TOKSIČNOSTI NA KVASCU <i>S. cerevisiae</i>	26
1.4.1. Test fermentacije na kvascu <i>S. cerevisiae</i>	27
1.4.2. Test toksičnosti bojanjem stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i> metilenskim modrilom.....	27
2. CILJ RADA.....	28
3. MATERIJALI I METODE.....	29
3.1 Materijali.....	29
3.1.1. Test organizmi	29
3.1.2. Uzorci surfaktanata	29
3.2. Metode	30
3.2.1. Utvrđivanje toksičnosti fermentacijskim testom na kvascu <i>S. cerevisiae</i>	30
3.2.1.1 Princip metode.....	30
3.2.1.2 Postupak.....	30
3.2.1.3 Izražavanje rezultata.....	33
3.2.2. Utvrđivanje toksičnosti testom metilenskog modrila na kvascu <i>S. cerevisiae</i>	34
3.2.2.1. Princip metode.....	34
3.2.2.2. Postupak.....	35
3.2.2.3 Izražavanje rezultata.....	36
4. REZULATATI I RASPRAVA.....	37
4.1. Rezultati.....	37
4.2. Rasprava.....	68
5. ZAKLJUČCI.....	78
6. LITERATURA.....	80

1. UVOD

Okoliš je prema **Zakonu o zaštiti prirode** definiran kao „prirodno okruženje, tlo, zrak, voda i more, klima, biljni i životinjski svijet u ukupnosti uzajamnog djelovanja i kulturna baština kao dio okruženja kojeg je stvorio čovjek“ (Narodne novine, 162/03).

Onečišćenje okoliša je „promjena stanja okoliša koja je posljedica štetnog djelovanja ili izostanka potrebnog djelovanja, ispuštanja, unošenja ili odlaganja štetnih tvari, ispuštanja energije i utjecaja drugih zahvata i pojava nepovoljnih po okoliš“ (Narodne Novine 162/03).

Izvori onečišćenja okoliša mogu biti prirodni i antropogeni.

U prirodne se izvore onečišćenja okoliša ubrajaju: erupcije vulkana, potresi, izvori plinova i vruće vode, udari meteora, vjetrovi oborine, buka itd.

Glavni čimbenici antropogenog onečišćenja okoliša su

- Tehnološka revolucija
- Demografska eksplozija
- Razvoj prometala.

Bitno je spomenuti da je otprilike 40% svake proizvodnje otpad. Otpadom se smatra svaka tvar ili predmet koje posjednik odbacuje, namjerava ili mora odbaciti. Ovisno o svojstvima otpada, otpad se može podijeliti na opasni, neopasni i inertni otpad.

Jedan od najvećih problema u smislu onečišćenja okoliša jesu upravo otpadne vode.

Otpadnim vodama nazivaju se vode koje su promijenile svoj prvobitni sastav unošenjem štetnih tvari čija prisutnost uzrokuje promjenu fizičkih, kemijskih, bioloških ili bakterioloških karakteristika vode (<http://www.kdvvik-rijeka.hr/default.asp?ru=114>) .

Štetna tvar je **Zakonom o zaštiti prirode** definirana kao „tvar čija su svojstva opasna za ljudsko zdravlje i okoliš s dokaznim akutnim i kroničnim toksičnim učincima, vrlo nadražujuća, kancerogena, mutagena, nagrizajuća, zapaljiva i eksplozivna tvar, ili tvar koja u određenoj količini i/ili koncentraciji ima takva svojstva“ (Narodne novine, 162/03).

Osim velikih industrijskih postrojenja upravo kućanstva predstavljaju ogroman izvor otpadnih voda koje u većini slučajeva ulaze u okoliš preko odvodnih kanala i sustava za pročišćavanje otpadnih voda.

Biološka razgradivost temeljno je svojstvo kućanskih otpadnih voda te se računa da 2/3 od ukupnih količina jesu tvari organskog podrijetla.

Osim urina i fecesa, papir, sapun i sintetski deterdženti najvažniji su konstituenti kućanskog otpada (Walker, 2001).

Različite površinski aktivne tvari (anionske, neionske, kationske i amfoterne) koje su sastavni dio deterdženata upotrebljavaju u ogromnim količinama u različitim industrijama i domaćinstvima. Njihova je industrijska primjena proširena na proizvodnju kozmetike, metala, papira i kože, pa se oni zbog toga mogu nalaziti u otpadnim vodama tih industrija u velikim količinama.

Mnoge od uobičajenih površinski aktivnih tvari imaju izrazito toksično i štetno djelovanje na okoliš i na ljudsko zdravlje, pa su zakonski propisi koji kontroliraju njihovo postojanje u otpadnim vodama dosta strogi: granice za otpuštanje površinski aktivnih tvari u tokove otpadnih voda u Hrvatskoj kreću se u rasponu od $\delta = 0,05$ do $0,10 \text{ mg/L}$.

Na toksičnost i biorazgradivost tih tvari u okolišu utječu mnogi fizikalni, kemijski i biološki čimbenici u međudjelovanju.

Procjene utjecaja proizvoda za domaćinstvo kao, što su deterdženti na okoliš temelje se na usporedbi predviđenih koncentracija u okolišu i koncentracija pri kojima nema primijećenog štetnog učinka na okoliš (Hennes-Morgan i de Oude, 1998).

Kompleksan sastav deterdženata u kojima se površinski aktivne tvari miješaju s ostalim komponentama također dovodi do sinergističkog učinka. Nadalje, deterdženti odnosno površinski aktivne tvari u njihovom sastavu mogu utjecati na biorazgradivost i toksičnost ostalih komponenata u okolišu.

Upravo zato potrebno je utvrditi toksičnost pojedinih sastojaka deterdženata te strogo regulirati njihovo otpuštanje u okoliš.

1.1. Deterdženti

Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti i sigurnosti deterdženata (Narodne novine, 77/07) deterdžent je definiran kao:

„ Svaka tvar ili pripravak koji sadrži sapune i/ ili druge površinski aktivne tvari namijenjene za procese pranja i čišćenja. Deterdženti mogu biti u obliku tekućine, praška, pasta, šipki, blokova, kalupom ili na drugi način oblikovanih komada, a stavljaju se u promet ili se rabe u kućanstvu ili u profesionalne ili industrijske svrhe,,.

Istim pravilnikom utvrđene su vrste deterdženata:

- **univerzalni deterdžent** jest deterdžent za sve temperature i vrste pranja
- **blagi deterdžent** jest deterdžent za pranje osjetljivih tkanina na nižim temperaturama pranja
- **industrijski deterdžent i deterdžent za profesionalnu uporabu** jest deterdžent za pranje i čišćenje izvan kućanstva, koje obavlja stručno osoblje rabeći posebne proizvode.

Deterdžentom se smatra i:

- pomoćni pripravak za pranje - namijenjen za namakanje (pretpranje), ispiranje ili izbjeljivanje odjeće i rublja u kućanstvu, itd.
- omekšivač za rublje - namijenjen za mijenjanje osjeta tkanine na dodir u procesima koji trebaju dopuniti pranje tkanine
- preparat za čišćenje - namijenjen kao univerzalno sredstvo za čišćenje za uporabu u kućanstvu i/ ili drugo čišćenje površina (npr.: materijala, proizvoda, strojeva, mehaničkih naprava, prijevoznih sredstava i njima povezane opreme, instrumenata, aparature, itd.)
- ostali preparati za čišćenje i pranje - namijenjeni za sve druge procese pranja i čišćenja.

Kao najraniji deterdženti u prošlosti se počinju koristiti pojedina ulja (biljnog porijekla), masti (životinjskog porijekla) te različiti abrazivi, poput mokrog pijeska i gline.

Kasnije se deterdženti počinju dobivati od saponina i goveđe žuči.

1913. g. belgijski kemičar A. Reychler počinje proučavati kemijsko djelovanje sintetskih surfaktanata. Nedugo nakon toga proizveden je 1917. U Njemačkoj prvi komercijalni deterdžent *Nekal* kao odgovor sve veći nedostatak sapuna za vrijeme Prvog svjetskog rata.

Do kraja Drugog svjetskog rata, deterdženti su se uglavnom upotrebljavali samo u industriji. Tada je u SAD došlo do otkrića tetrapropilena koji se počinje koristiti u proizvodnji kućanskih deterdženata, što je u 40-im godinama rezultiralo naglim porastom široke upotrebe deterdženata u kućanstvima.

Kasnih 60-ih godina također u SAD-u proizvedeni su prvi biološki detergentsi, koji u svom sastavu od tada sadržavaju i različite enzime koji pridonose boljem uklanjanju proteinskih mrlja.

Deterdženti su po svom kemijskom sastavu vrlo komplicirana smjesa različitih tvari, te osim vode najčešće se sadrže sljedeće tvari:

- fosfate
- fosfonate
- anionske površinski aktivne tvari
- kationske površinski aktivne tvari
- amfoterne površinski aktivne tvari
- neionske površinski aktivne tvari
- izbjeljivače na bazi kisika
- izbjeljivače na bazi klora
- EDTA-u i njezine soli
- NTA (nitrilotrioctenu kiselinu) i njezine soli
- fenole i halogenirane derivate fenola
- paradiklorbenzen
- aromatske ugljikovodike
- alifatske ugljikovodike
- halogenirane ugljikovodike
- sapune
- zeolite
- polikarboksilate
- enzime
- dezinficijense
- optička bjelila
- mirise.

Navedene tvari mogu svrstati u 4 osnovne kategorije:

- surfaktanti (tenzidi ili površinski aktivne tvari)
- punila
- bjelila
- aditivi.
-

1.2. Surfaktanti

Termin *surfaktant* (često se koristi i termin *tenzid*) označava mješavinu površinski aktivnih tvari. To su tvari koje snižavaju površinsku napetost između dvije faze.

Naziv **surfaktant** nastao je 1950.g. u tvornici „Antara products“.

Isti termin koristi se i u medicinskoj terminologiji, gdje se njegovo značenje odnosi na lipoproteinske komplekse u plućima, koji su zaslužni za nisku površinsku napetost na granici tekućina-zrak u plućima. Oni ne samo da olakšavaju disanje na način što smanjuju napor potreban za respiraciju, nego djeluju i na alveole sprečavajući da dođe do njihovog kolapsa. Naime, kada bi djelovala samo površinska napetost vode u plućima, napetost u alveolama bi bila jako velika te bi bila potrebna velika energija da se nadjača ta napetost i omogući širenje pluća. Kod sisavaca se surfaktanti javljaju kod fetusa prije rođenja smanjujući sile potrebne za povećanje pluća novorođenčadi tijekom disanja.

Prema Članku 2 „Pravilnika o zdravstvenoj ispravnosti i sigurnosti deterdženata“ („Narodne novine“ broj 77/07) **surfaktant ili površinski aktivna tvar** je definirana kao:

„Bilo koja organska tvar i/ ili pripravak koji se koristi u proizvodnji deterdženata i ima svojstva površinskog djelovanja, a sastoji se od jedne ili više hidrofilnih i jedne ili više hidrofobnih skupina koje su takve naravi i veličine da tvar ima sposobnost umanjiti površinsku napetost vode i stvarati jednostruke slojeve sa svojstvom širenja ili adsorpcije na graničnoj površini vode i zraka, kao i stvarati emulzije i/ ili mikroemulzije i/ ili micle, te se adsorbirati na graničnim površinama vode i čvrste tvari.“

Surfaktant ili površinski aktivna tvar zapravo je spoj koji otopljen u vodi daje proizvodu čiji je sastavni dio, mogućnost da ukloni nečistoću s određene površine, bilo da se radi o koži, tekstilu ili nekoj drugoj površini.

Surfaktanti djeluju na način da snižuju površinsku napetost medija u kojem su otopljeni.

Snizavanjem površinske napetosti između dva medija ili površine (npr. zrak/voda, voda/prljavština, prljavština/tkanina) surfaktant igra ključnu ulogu u suspendiranju i uklanjanju prljavštine.

Niža površinska napetost olakšava proces uklanjanja prljavštine s posuđa, odjeće i drugih površina, te pomažu da ona ostane suspendirana u vodi.

Surfaktanti mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla.

Surfaktanti prirodnog podrijetla (biljnog ili životinjskog) poznati su kao oleo-spojevi.

Oni biljnog podrijetla dobivaju se npr. iz palmi, a oni životinjskog podrijetla dobivaju se preradom različitih lojeva.

Surfaktanti sintetskog podrijetla nazivaju se petro-spojevima te se dobivaju uglavnom preradom nafte.

Surfaktanti zbog svojih svojstava imaju najveću primjenu u kozmetičkoj i industriji sredstava za pranje i čišćenje, međutim, zastupljeni su također i u drugim industrijama, osobito tekstilnoj kao sredstva za vlaženje, emulgaciju i omekšavanje tkanina.

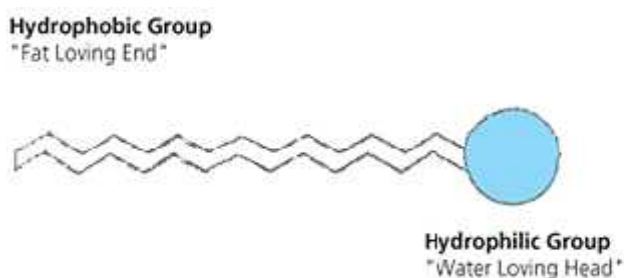
Osim toga imaju i široku praktičnu primjenu u proizvodnji boja i lakova, tinta, proizvoda za skidanje tinte s papira za reciklažu, proizvoda koji smanjuju pjenušanje, voskova za skije i snowbordove, agrokemijskih spojeva (neki herbicidi i insekticidi), proizvoda koji se koriste u vatrogastvu, laksativa, spermicida, itd.

Surfaktanti su u kozmetičkim proizvodima i industriji zastupljeni su u sljedećih 6 kategorija:

- Deterdženti – za pranje i čišćenje
- Emulgatori – u kremama i losionima
- Čimbenici pjenušanja – u šamponima
- Čimbenici za poboljšanje kvalitete – u proizvodima za njegu kože i kose
- Čimbenici za vlaženje
- Otapala – parfemima i mirisima.

Građa molekule surfaktanata

Struktura svakog surfaktanta sastoji se od hidrofobnog i hidrofilnog dijela molekule (Slika 1). Hidrofobni dio čini alifatski ugljikovodični lanac, koji može biti ravan ili razgranat. Hidrofilni dio molekule ima afinitet prema vodi, a to može biti neka hidrofilna skupina, kao npr: karboksilna, sulfatna, sulfonska, ortofosforna, amino, sulfonamidna i sl.



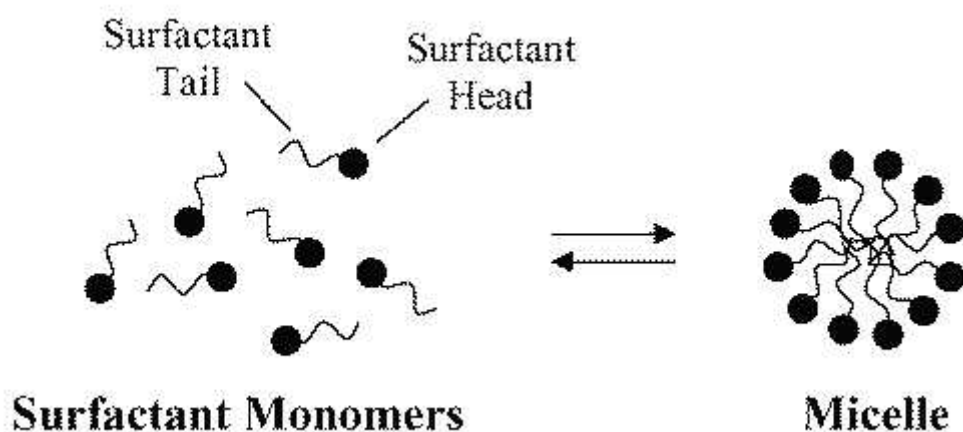
Slika 1. Model građe molekule surfaktanta.

Tijekom procesa uklanjanja nečistoće hidrofobni dio veže se za masni dio nečistoće, dok hidrofilni dio preko vodikovih veza uspostavlja interakciju s vodom. Te dvije suprotstavljene sile omogućuju „dizanje“ nečistoće s neke površine, te njezinu suspenziju u vodi.

Pri povećanoj koncentraciji surfaktanta, dolazi do agregacije molekula surfaktanata u submikroskopske čestice koje nazivamo **micele**. Koncentracija surfaktanta pri kojoj počinje formiranje micela naziva se **kritična micelarna koncentracija**.

Građa micela

Micele su građene od nekoliko stotina molekula surfaktanata tako da se njihovi hidrofilni dijelovi („glave“) okreću prema vodi, dok su hidrofobni lanci („repovi“) orijentirani prema unutrašnjosti, gdje tvore jezgru koja može inkapsulirati npr. kapljicu ulja, dok polarni vanjski dio preko vodikovih veza održava interakciju s vodom (Slika 2).



Slika 2. Proces formiranja micela iz monomera surfaktanata u vodi.

Ovo svojstvo omogućava otapanje dvije faze koje se inače ne miješaju, a time i prividno povećanje topljivosti.

Mehanizam djelovanja surfaktanata

Surfaktanti pri otklanjanju nečistoće (mrlje) djeluju na 3 načina:

1. „Roll up“ mehanizam

Surfaktanti svojim hidrofobnim dijelovima okružuju mrlju, dolazi do snižavanja površinske napetosti na granici mrlja/otopina, te tkanina/otopina. Hidrofilni dijelovi molekule surfaktanta okrenute su vodenj fazi, te mrlju „vuku“ prema vodi, odmičući je s površine tkanine ili neke druge površine (Slika 3).

Nakon toga dolazi do suspendiranja čestica mrlje u vodi kako bi se one lakše uklonile.



Slika 3. Okruživanje čestice nečistoće molekulama surfaktanata.

2. Stvaranje emulzije

Surfaktant djeluje tako da snižuje površinsku napetost na granici masna mrlja/voda te olakšava proces emulgacije masne mrlje, odnosno njenog raspršivanja u sitne kapljice (Slika 4), koje se potom miješaju s vodom stvarajući emulziju.



Slika 4. Raspršivanje masne mrlje u sitne kapljice (emulgacija).

3. Povećavanje topljivosti

Preko interakcije s micelima surfaktanta u otapalu (vodi), tvar se spontano otapa te se formira stabilna i čista otopina.

Surfaktanti se najčešće klasificiraju u 4 osnovne skupine:

- Anionski
- Kationski
- Neionski
- Amfotermni.

1.2.1. Anionski surfaktanti

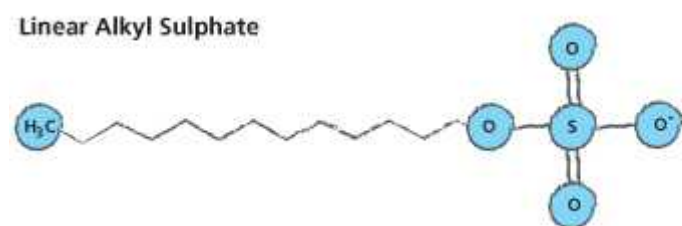
U otopini njihova glava nosi negativan naboj. Ta skupina surfaktanata najzastupljenija je u deterdžentima za pranje rublja i posuđa jer su posebno učinkoviti pri uklanjanju masnih mrlja, te u šamponima zbog svojih izvrsnih svojstava pjenušanja.

Anionski surfaktanti mogu uključiti anionske organske surfaktante, obično zastupljene u obliku topivih soli, točnije alkalijske metalne soli, posebno natrijeve.

Najčešće korišteni anionski surfaktanti su sulfonati ili sulfati.

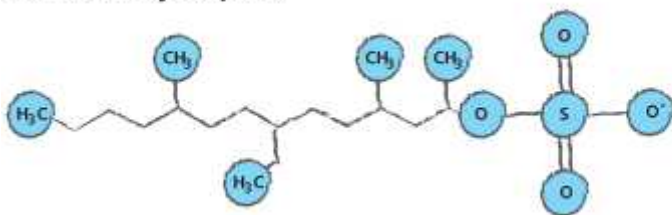
Predstavnici anionskih surfaktanata su:

- alkilbenzensulfonati (TPS – tetrapropilenbenzensulfonat, LAS – alkilbenzensulfonat)
- sekundarni alkansulfonati (SAS)
- natrij alkansulfonati
- alkilsulfati (AS) koji mogu biti ravni (Slika 5) i razgranati (Slika 6)
- alkiletersulfati (AES) (Slika 7).



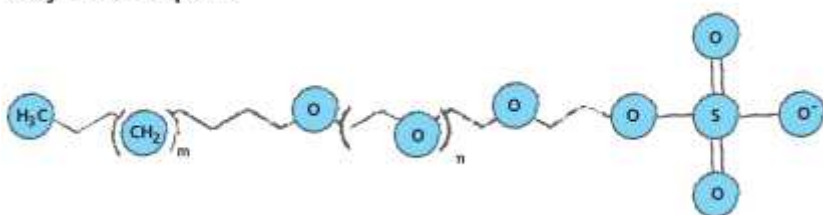
Slika 5. Model građe linearnog alkilsulfata (AS).

Branched Alkyl Sulphate



Slika 6. Model građe razgranatog alkilsulfata (AS).

Alkyl Ether Sulphate



Slika 7. Model građe alkiletersulfata (AES).

U skupinu anionskih surfaktanata pripadaju također i neke masne kiseline (Slika 8).

Fatty Acids/Soaps



Slika 8. Model građe masne kiseline.

Loša strana anionskih surfaktanata je da posebno u tvrdoj vodi mogu reagirati s ionima poput Ca^{2+} i Mg^{2+} što može uzrokovati njihovu deaktivaciju ili smanjiti njihov učinak.

Što je voda tvrđa, dakle što je više kalcija i magnezija prisutno u vodi, to je djelovanje anionskih surfaktanata manje.

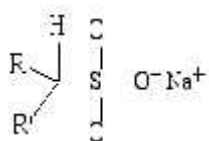
Da bi se to spriječilo u deterdžente koji sadrže anionske surfaktante dodaju se drugi sastojci koji djeluju na smanjenje tvrdoće vode.

Od anionskih surfaktanta u ovom radu korišteni su:

- Hospatur SAS 60
- Kutriacid 95 A
- Lutensit TC-EHS
- Na- Cumolsulfonat 40
- Solfodac AC 3-I
- SDS (Na - dodecil sulfat)
- Texapon LS 35.

Hospatur SAS 60

Po kemijskom sastavu to je sekundarni alkansulfonat.



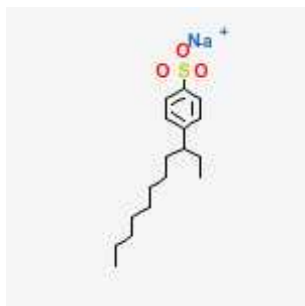
Koristi se u gotovo svim tipovima tekućih sredstava za pranje i čišćenje, posebno u onim visoko koncentriranim.

Karakterizira ga dobra topljivost te mala viskoznost, a vrlo je stabilan pri različitim pH vrijednostima, te u prisutnosti oksidansa poput hipoklorita i peroksida.

Biorazgradiv je i vrlo blag prema koži.

Kutriacid 95 A

Po kemijskom sastavu to je linearni alkilbenzensulfonat (Slika 9).



Slika 9. Strukturna formula linearnog alkilbenzensulfonata (LAS).

Lutensit TC-EHS

Po kemijskoj građi lutensit je alkil sulfat (AS).

Različite vrste lutensita imaju širok spektar primjene.

U tehnološko-kemijskoj industriji koristi se za ionsku stabilizaciju pri polimerizaciji emulzija.

Također se često koristi u kućanstvima, u višenamjenskim sredstvima za čišćenje sanitarija i podova zbog svoje izvanredne površinske aktivnosti.

Vrlo često se lutensit u deterdžentima kombinira s drugim vrstama surfaktanata.

Na-Cumolsulfonat

Po kemijskom sastavu to je alkilbenzensulfonat (LAS).

Solfodac AC 3-I

Po kemijskom sastavu to je linearni alkilbenzensulfonat (LAS), slične građe kao i Kutriacid 95 A.

SDS (Na - dodecil sulfat)

Surfaktant koji se koristi u mnoštvu proizvoda za čišćenje i osobnu higijenu, a dolazi u obliku kristaličnog praška bijele boje.

Molekula ima rep od 12 C atoma prihvaćen za sulfatnu skupinu (Slika 10).



Slika 10. Strukturna formula Na-dodecil sulfata.

Poznata je upotreba SDS-a u razdvajanju proteina u elektroforezi u tehnici koja se naziva **SDS page**.

Prilikom elektroforeze SDS djeluje na način da denaturira proteine ometajući stvaranje nekovalentnih veza unutar proteina, čime se narušava njihov prirodan izgled i konformacija. Anioni SDS-a vežu se za glavni peptidni lanac na način da se jedan SDS veže na dva aminokiselinska ostatka. Konačni rezultat je odvajanje proteina prema njihovoj molekularnoj masi.

Texapon LS 35

Po kemijskoj građi to je alkilsulfonat (AS).

Koristi se kao osnovni surfaktant u kozmetičkoj industriji u proizvodima za čišćenje, kao i u deterdžentima za pranje posuđa. Blago žute je boje, dolazi u obliku tekućine ili paste.

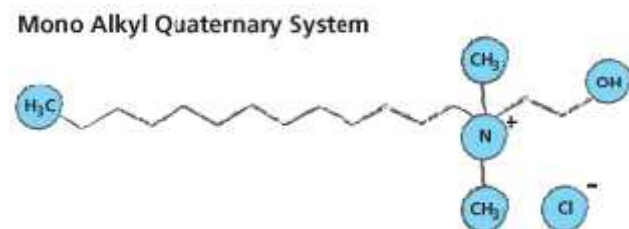
1.2.2. Kationski surfaktanti

U otopini njihova glava nosi pozitivan naboj. Postoje 3 različite kategorije kationskih surfaktanata, te je njihova primjena u skladu s tim različita, a spektar ovisi o njihovoj sposobnosti adsorpcije na negativno nabijene površine. Vrlo se dobro adsorbiraju na površinu prirodnih vlakana (lan, pamuk, vuna) dok je adsorpcija na sintetska vlakna puno slabija.

Kationski surfaktanti obuhvaćaju imadizole te kvartarne amonijeve spojeve:

Imadizoli su iznimno termostabilni pa se koriste u preradi bitumena, a također je poznata i njihova primjena kod sprečavanja korozije. Radi se o tome da oni stvaraju tanak pjenasti sloj na površini metala koji onda ima zaštitnu ulogu.

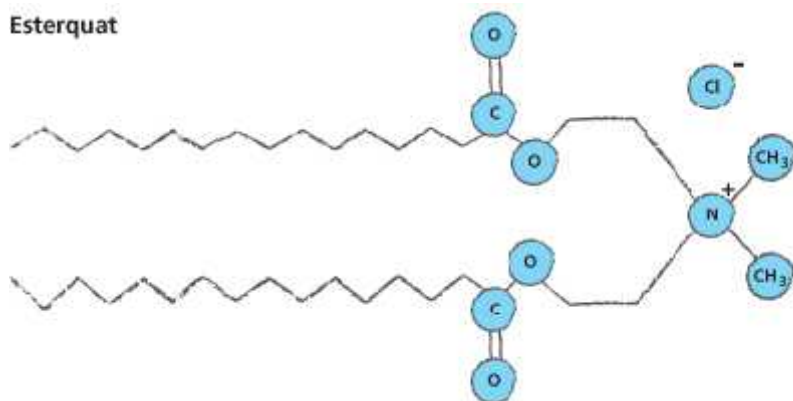
Kvartarni amonijevi spojevi (Slika 11) imaju baktericidan efekt, te se zato primjenjuju u dezinfekcijskim sredstvima za čišćenje. Mogu se vezati za proteine i nukleinske kiseline, narušiti integritet membrane, te uzrokovati gubitak citoplazmatskih iona i makromolekula.



Slika 11. Model građe kvarterne amonijeve soli.

Postoje tri osnovna tipa kationskih surfaktanata.

Predstavnik prvog tipa je esterquat (EQ), preparat koji se dodaje kao omekšivač pri ispiranju rublja (Slika 12).



Slika 12. Model građe kationskog surfaktanta esterquata.

Drugi tip kationskih surfaktanata koristi se u deterdžentima za pranje rublja, gdje poboljšavaju orijentaciju anionskih surfaktanata na granici mrlje i vode. To pridonosi smanjenju površinske napetosti između mrlje i vode. Osobito su uspješni pri uklanjanju masnih mrlja.

Treći tip kationskih surfaktanata zbog svojih dezinfekcijskih karakteristika ima široku primjenu u kućanstvima, osobito u proizvodima za čišćenje kupaoonica.

U ovom radu od kationskih je surfaktanata korišteni su:

- Servamine KOO 330
- N – Hexadecylpyridinium chloride
- N – Dodecylpyridinium chloride.

Sama toksičnost pojedinog surfaktanta ovisi o duljini N- alkiliranog lanca.

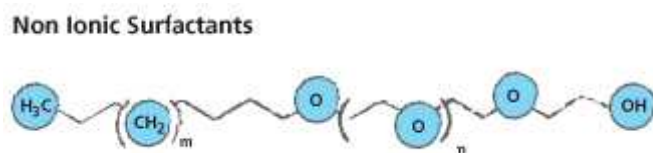
Najveća toksičnost zabilježena je kod spojeva koji sadržavaju lanac od 14 C atoma.

1.2.3. Neionski surfaktanti

Surfaktanti koji pripadaju u ovu skupinu nemaju neto naboj, što ih čini otpornima na deaktivaciju u tvrdoj vodi. Odlični su odstranjivači masnoće koji se koriste u deterdžentima za pranje rublja, sredstvima za čišćenje u kućanstvu, te tekućim deterdžentima za pranje posuđa. Najveći broj deterdženata za rublje sadrži mješavinu anionskih i neionskih surfaktanata koji međusobno upotpunjuju svoje djelovanje, gdje neionski osiguravaju manju osjetljivost prema tvrdoći vode.

Predstavnici neionskih surfaktanata su alkohol etoksilati (AE), alkilfenol etoksilati (APE), alkanolamidi masnih kiselina (FAA), alkliamin oksidi, N-metilglukamidi (NMG) i alkilpoliglikozidi (APG).

Najčešće korišteni neionski surfaktanti su eteri masnih alkohola (Slika 13).



Slika 13. Model građe neionskog surfaktanta.

Iz skupine neionskih surfaktanata u ovome radu korišteni su:

- Arlypon VPC
- Empilan KI 8
- Ethomeen T/15
- Genapol PF 20.

Arlypon VPC

Po kemijskoj građi radi se o mješavini etoksiliranih masnih alkohola i etoksiliranih masnih amina. Pri 25°C nalazi se u tekućem stanju.

Koristi se u kiselkastim otopinama, npr hidrokloridnoj, fosfornoj, limunskoj, sulfamatnoj, te drugim otopinama kiselina. Kad se takvim otopinama doda Arlypon VPC dolazi do povećanja viskoznosti, što ovisi o količini kiseline, dodanih mirisa te samog Arlypona u formulaciji. Povećanjem viskoznosti povećava se vrijeme u kojem se deterdžent zadržava na nekoj površini, čime se kiselini omogućava dulji period da proдре u unutrašnjost mrlje ili neke druge nečistoće, te je ukloni. Najčešće se upotrebljava se u proizvodima za čišćenje WC-a, kupaoonica te vozila, a može se kombinirati sa svim vrstama anionskih, kationskih te amfotermnih surfaktanata.

Empilan KI 8

Po kemijskoj građi to je alkohol etoksilat.

Koristi se u proizvodima za njegu kose, šamponima i regenerativima, te u raznim proizvodima za njegu tijela.

Ethomeen T/15

Po kemijskoj građi Ethomeen T/15 je etoksilirani amin.

Upotrebljava se u višenamjenskim sredstvima za čišćenje te sredstvima za uklanjanje masnoće, voskovima za automobile te industrijskim sredstvima za čišćenje.

Genapol PF 20

Kemijska građa: polimer etilen oksida i propil oksida.

Koristi se u tekućim ili praškastim deterdžentima i sredstvima za čišćenje te u nekim emulgatorima.

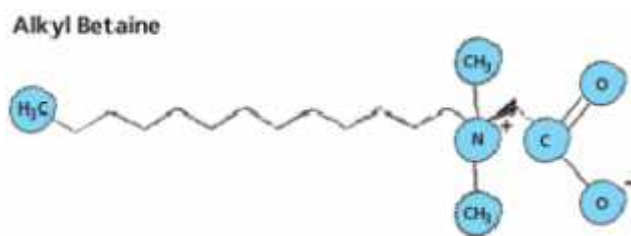
1.2.4. Amfotermni surfaktanti

Ta vrsta surfaktanata iznimno je blaga, pa su pogodni za upotrebu u proizvodima za osobnu njegu poput šampona i gelova za tuširanje jer imaju izvanredne dermatološke osobine, te u proizvodima za čišćenje kućanstva poput blagih deterdženata za pranje posuđa, dok se u deterdžentima za pranje rublja rijetko koriste prvenstveno zbog svoje visoke cijene.

Ovisno o pH otopine te interakcijama, u otopini mogu biti u anionskom obliku (pozitivno nabijeni), kationskom (negativno nabijeni) ili u neionskom obliku (bez naboja).

U deterdžentima se mogu kombinirati sa svim ostalim tipovima surfaktanata, a topivi su i djelotvorni u prisutnosti veće koncentracije elektrolita, kiselina ili lužina.

Primjer amfoternog surfaktanta je alkilbetaine koji čak i u vodenoj otopini u istoj molekuli posjeduje i anionske i kationske skupine (Slika 14).



Slika 14. Model građe amfoternog surfaktanta alkilbetaina, vidi se anionska i kationska skupina.

Od amfoternih surfaktanata u ovome radu korišten je Oxidet DM-4.

Oxidet DM 4

Kemijsko ime ovog surfaktanta je miristamin oksid, na temperaturi 20 °C dolazi u tekućem obliku. Duljina alkilnog lanca je 14 C atoma.

Na njegovu viskoznost te ionijski karakter utječe pH, pa je tako pri niskom pH u kationskom obliku. Koristi se kao parfemsko otapalo, a u otopinama hipoklorita povećava gustoću.

Osim pri uklanjanju mrlja, surfaktanti imaju i važnu ulogu u sprečavanju njihovog ponovnog vraćanja na površinu ili tkaninu s koje su netom uklonjeni. To se događa putem dva mehanizma:

1. Elektrostatske interakcije

Ovaj mehanizam sprečavanja ponovnog prijanjanja mrlje na neku površinu karakterističan je za anionske surfaktante. Naime, anionski se surfaktanti adsorbiraju i na površinu mrlje koja je dispergirana u otopini deterdženta i na površinu tkanine. Tako se stvara negativan naboj na obje površine, to uzrokuje elektrostatsko odbijanje, što sprečava ponovno prijanjanje mrlja.

Međutim, kad je prisutna tvrda voda, taj mehanizam zapravo djeluje kao most između suspendirane mrlje i tkanine. Zato je potrebna upotreba tvari koje smanjuju tvrdoću vode (na način da na sebe vežu ione Ca^{2+} i Mg^{2+}).

2. Steričke prepreke

Mehanizam steričkih prepreka pri sprečavanju ponovnog prijanjanja mrlja karakterističan je za neionske surfaktante. Uzmimo za primjer alkohol etoksilat koji se također adsorbira na mrlju, dok se njegovi dugi etoksilirani lanci se rasprostranjuju u vodi, te tako sprečavaju ponovno nakupljanje masnih i drugih čestica prljavštine u veće nakupine na površini tkanine.

1.3. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Pivski ili pekarski kvasac. Ime mu dolazi od grčke riječi *saccharo* što znači „od šećera“ te *myco* što znači gljiva. *Cerevisiae* pak dolazi od latinske riječi a označava „pivo“.

Smatra se da je izoliran iz kore grejpa. Kvasac se često može vidjeti na nekim tamnim plodovima voća poput šljiva u obliku tankog bijelog filma na površini ploda.

Od antičkih vremena poznata je njegova primjena u pekarstvu i proizvodnji piva.

Još od najstarijih vremena čovjek se koristio vrenjem koje uzrokuju kvasci. Postupak pečenja kruha s kvascem Egipćani i Babilonci poznavali su 2000 godina prije Krista, o čemu postoje zapisi u hijeroglifima. U ostalim dijelovima svijeta on se porširio mnogo kasnije. Egipćani su postupak fermentiranja smatrali mudrošću i milošću boga Ozirisa, a pravi je princip fermentacije ostao misterij sve do 17. st. kada je Leeuwenhoek izumom mikroskopa utvrdio postojanje stanica kvasca (1676 g). 1800. g. Louis Pasteur proučavao je što je to u kvascu što diže tijesto, te je otkrio sam proces fermentacije.

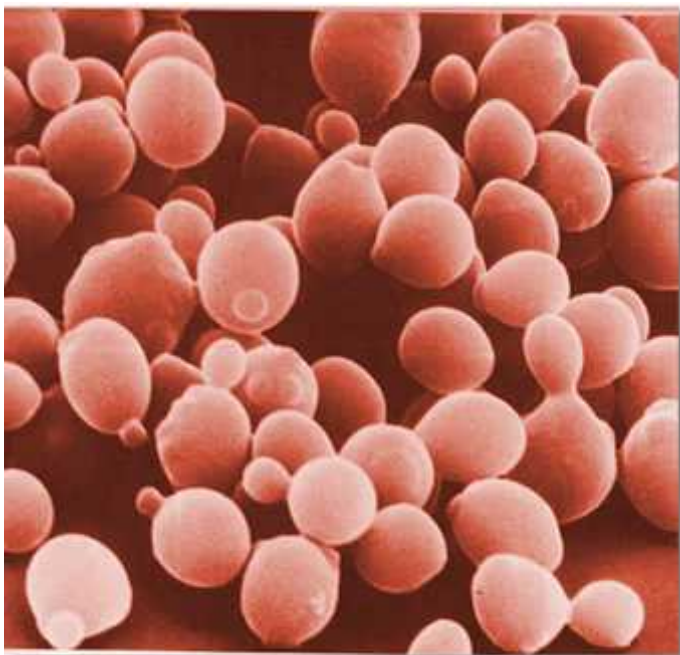
Kvasci spadaju u carstvo gljiva, odjel *Ascomycota* ili gljive mješinarke.

Morfologija kvasaca je vrlo jednostavna i potpuno se razlikuje od morfologije ostalih gljiva. Kvasci su jednostanične gljive te se uglavnom javljaju kao pojedinačne stanice i to najčešće nerazgranate, a kolonije kvasaca imaju u pravilu glatku površinu. Stanice su uglavnom jajolikog oblika i obično su velike, 5-8 µm u promjeru.

Neki rodovi kvasaca tijekom rasta u anaerobnim uvjetima tvore vrlo izdužene stanice koje podsjećaju na hife plijesni. Te stanice nazivamo pseudohife, a njihov splet pseudomicelij.

Osnovni tip stanice u kvasaca jest blastospora. Blastospora je kuglasta ili jajolika stanica koja se razmnožava nespolnim načinom, pupanjem ili poprečnom diobom. Na blastopori izrasta pup koji se otkine kada dosegne veličinu osnovne stanice.

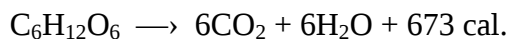
Vegetativno se razmnožavaju se pupanjem. U stadiju pupanja, roditeljska stanica (stanica majka) stvara pup (stanicu kćer) na svojoj vanjskoj površini. Kako pup raste, jezgra roditeljske stanice se dijeli, a potom jedna jezgra odlazi u pup. Stanični materijal se potom podijeli između pupa i roditeljske stanice, nakon čega se pup otkida. (Slika 15). Smatra se da se svaka roditeljska stanica može dati ograničen broj pupova, 30 – 40, a nakon toga se prestaje dijeliti. Svaki put kada se kvasac razmnožava pupanjem, na mjestu pupa nastaje ožiljak, pa se prema broju ožiljaka može utvrditi koliko je potomaka dala jedna roditeljska stanica.



Slika 15. Mikroskopski prikaz stanica kvasca u pupanju.

U nepovoljnim uvjetima nastupa spolno razmnožavanje. U uvjetima nedostatka hrane stanice kvasca podliježu mejozi. U tom procesu se unutar stanice majke stvaraju četiri ili više nepokretnih stanica (spora) s debelim staničnim stijenkama u kojima ostaju sve dok ponovno ne bude dovoljno hrane. Stanična stijenka roditeljske stanice funkcionira kao askus, tj. vrećica koja sadrži spore, zbog čega se spolne stanice većine kvasaca nazivaju askospore.

Po načinu života kvasci su fakultativni anaerobni. Kao konačni akceptor elektrona mogu upotrijebiti kisik ili neki organski spoj. Ako raspolažu dovoljnom količinom kisika, nastupa proces aerobne respiracije pri čemu nastaju ugljični dioksid i voda.



U anaerobnim uvjetima nastupa proces fermentacije ugljikohidrata pri čemu nastaje etanol i ugljični dioksid.



Upravo na toj reakciji fermentacije, odnosno vrenja zasniva se proizvodnja piva, vina i pekarskih proizvoda.

Princip fermentacije korišten je i u testu fermentacije na kvascu *S. cerevisiae* koji sam provela u svom istraživanju.

Kvasci mogu rasti u širokom rasponu pH vrijednosti i u 18%-tnom etanolu, a mnogi rastu u prisutnosti 55-60% saharoze.

Svi oblici *S. cerevisiae* mogu rasti aerobno na glukozu, maltozu i trehalozu, ali ne i na laktozu i celobiozu. Pokazalo se da su glukoza i fruktoza dva najbolja šećera za fermentaciju. Mogućnost kvasca da koristi pojedini šećer može ovisiti o tome da li se uzgaja u aerobnim ili anaerobnim uvjetima.

Svi sojevi mogu koristiti amonijak i ureu kao izvor dušika, ali ne i nitrata jer ih ne mogu reducirati do amonijskih iona. Kao izvor dušika također mogu koristiti i većinu aminokiselina, neke male peptide te dušične baze. Također zahtijevaju fosfor u obliku dihidrogenfosfatnog iona, te sumpor koji mogu primiti u obliku sulfatnih iona ili u organskom obliku, kao metionin ili cistin. Za rast su mu također potrebni i neki metalni ioni poput magnezija, željeza, kalcija i cinka.

S. cerevisiae je najproučavaniji eukariotski modelni organizam u molekularnoj i staničnoj biologiji, a ima velik značaj i u istraživanjima na području genetike, fiziologije i medicine. Prvi je eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran.

Mnogi važni proteini poput proteina staničnog ciklusa, signalnih proteina te enzima za sintezu proteina, otkriveni su upravo proučavanjem njihovih homologa u kvascu.

Karakteristike *S. cerevisiae* i razlozi zašto je postao model organizam su sljedeći:

- Nepatogen je i jednostavan za uzgoj u laboratorijskim uvjetima
- Lako se kultivira
- Poznata mu je fiziologija i životni ciklus
- Kratko generacijsko vrijeme (oko 90 min.)
- Mogućnost križanja velikog broja jedinki
- Lako se transformira stranom DNA
- Uspješna homologna rekombinacija.

Genom kvasca je približno 3,5 puta veći od genoma *E. coli*, te oko 250 puta manji od genoma čovjeka. Kvasac ima oko 5800 gena, a 70 % od ukupne količine DNA je kodirajuće.

2001. godine Lee Hartwell dobio je Nobelovu nagradu iz područja medicine i fiziologije za istraživanje gena za mitozu kvasaca jer su rezultati tih istraživanja značajno pridonijeli razumjevanju nastajanja raka.

1.4. Testovi toksičnosti na kvascu *S. cerevisiae*

Toksičnost je svojstvo ili svojstva tvari koja imaju štetan učinak na biološki sustav. Testovi toksičnosti provode se u svrhu svrstavanja kemikalija u određene kategorije po njihovoj toksičnosti.

U dovoljno velikoj količini, bilo koja kemikalija može imati štetan učinak na organizam. Pri izlaganju organizama nekoj štetnoj supstanci vrlo je bitna doza ili stvarna količina tvari koja uđe u organizam. Pa tako niske doze ne moraju uopće izazvati nikakav učinak, ili pak mogu što je vrlo čest slučaj, djelovati stimulirajuće na rast organizma. Visoke doze s druge strane mogu dovesti do smrti organizma.

Odnos doze i biološkog učinka naziva se doza-reakcija i temelj je za procjenu opasnosti i rizika koji predstavljaju tvari u okolišu. (Landis, 1999).

Pokazatelji toksičnosti su biološki, fiziološki, reproduktivni i učinci na ponašanje. Toksičnost se može mjeriti na mnogo načina, a najčešća mjera je smrt organizma.

U testovima letalne toksičnosti LD₅₀ predstavlja srednju letalnu dozu, tj. dozu koja uzrokuje mortalitet kod 50% ispitivanih jedinki, dok LC₅₀ predstavlja srednju letalnu koncentraciju, tj. koncentraciju koja uzrokuje učinak kod 50% ispitivanih jedinki.

U testovima toksičnosti u kojima se mjere učinci koji nisu smrtnost, određuju se EC₅₀ i ED₅₀. EC₅₀ je efektivna koncentracija koja uzrokuje učinak kod 50% ispitivanih jedinki, dok je ED₅₀ efektivna doza koja uzrokuje učinak kod 50% ispitivanih jedinki. Također se upotrebljava i IC₅₀ koja predstavlja inhibicijsku koncentraciju koja smanjuje uobičajeni odgovor organizma za 50%. IC₅₀ vrijednost se često koristi za mjerenje rasta alga, bakterija i ostalih organizama (Walker, 2001).

U dva testa koja provela u svome radu mjerena je efektivna koncentracija koja uzrokuje učinak kod 50% ispitivanih jedinki (EC₅₀), a testovi će ukratko biti opisani u daljnjem tekstu.

1.4.1. Test fermentacije na kvascu *S. cerevisiae*

S. cerevisiae test, nazvan još i Yeast Toxicity Test (YTT) zasniva se na činjenici da kvasac može fermentirati saharozu do ugljikova (IV) oksida. Ako se uz saharozu u uzorku nalazi tvar (u ovome istraživanju otopine surfaktanata u različitim razrjeđenjima) koja će djelovati na kvasac i sprječavati fermentaciju, količina nastalog CO₂ u usporedbi s kontrolnim uzorkom bit će smanjena, ili CO₂ uopće neće nastati.

Fermentacija saharoze odvija se u hermetički zatvorenim fermentacijskim bočicama koje sadrže tekući medij. Tijekom fermentacije nastaje plin koji u otvoreni injekcijski cilindar istiskuje ekvivalentni volumen tekućine. Mjerenjem volumena istisnute tekućine, moguće je indirektno procijeniti količinu plina nastalog tijekom fermentacije kao i intenzitet fermentacije (Hrenović i sur., 2005).

Ova metoda hranjivog bujona u zatvorenim bočicama sa injekcijskim cilindrima je modifikacija originalne YTT metode (Stilinović, 1981).

1.4.2. Test toksičnosti bojenjem stanica kvasca *S. cerevisiae* metilenskim modrilom

Ova metoda za određivanje toksičnosti temelji se na bojanju stanica kvasca metilenskim modrilom koje se koristi kao indikator da li su stanice žive ili mrtve. Metilen plavo inhibira respiraciju jer služi kao akceptor vodikovih protona nastalih pri respiraciji, što znači da ih kvasci ne mogu koristiti dalje u metabolizmu za proizvodnju energije. Dolazi do redukcije boje vodikovim protonima, a metilen plavo se u reduciranom obliku obezboji. Dakle ako je stanica živa, tj. ako su prisutni aktivni enzimi, dolazi do promjene plave boje u bezbojnu (stanice kvasca pod mikroskopom su vidljive kao bijele). Plava boja ne mora nužno značiti da je stanica mrtva, nego može biti znak da je ona samo fiziološki oslabljena, odnosno da su sami enzimi inaktivirani ili denaturirani.

Metoda se zasniva na direktnom brojanju stanica pod mikroskopom, računa se brojčani odnos živih i mrtvih stanica na 100 izbrojenih, te se na posljetku izračuna postotak inhibicije pri određenoj koncentraciji prisutne toksične tvari, u ovom slučaju pojedinog surfaktanta.

Prema dobivenim podacima, te prema grafičkom prikazu izračunava se efektivna koncentracija (EC₅₀) za pojedinu toksičnu supstancu (Stilinović, 1981).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je utvrditi stupanj toksičnosti 15 komercijalnih surfaktanata na kvasac *S. cerevisiae*, te odrediti prosječnu efektivnu koncentraciju koja uzrokuje učinak kod 50% ispitivanih jedinki (EC_{50}) za svaki pojedini uzorak.

Korištena su dva testa za procjenu toksičnosti komercijalnih surfaktanata na kulturu kvasca *S. cerevisiae*:

1. Test fermentacije (Stilinović, 1981)
2. Test procjene toksičnosti bojenjem metilenskim modrilom.

Kao test organizam u oba testa korišten je kvasac *S. cerevisiae*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Test organizmi

Kao test organizam u ovom radu korišten je soj kvasca *S. cerevisiae* ATCC 64252 (American Type Culture Collection, Manassas, VA,. USA).

3.1.2. Uzorci surfaktanata

Korišteno je 15 komercijalnih surfaktanata:

Servamine KOO 330, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Ethomeen T/15, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Arlypon VPC, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Kutriacid 95 A, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Oxidet DM-4, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Empilan KI 8, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Lutensit TC-EHS, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Genapol PF 20, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Na-Cumolsulfonat 40, iz Labuda d.o.o., Zagreb

Texapon LS 35, iz Saponije d.d., Osijek

Hostapur SAS 60, iz Saponije d.d., Osijek

Solfodac AC-3-I, iz Saponije d.d., Osijek

SDS (Na-dodecil sulfat), iz Merck & Co., Inc., USA

N-Hexadecylpyridinium chloride, iz Merck & Co., Inc., USA

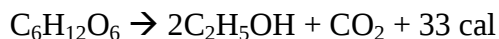
N-Dodecylpyridinium chloride, iz Merck & Co., Inc., USA

3.2. METODE

3.2.1. Utvrđivanje toksičnosti fermentacijskim testom na kvascu *S. cerevisiae*

3.2.1.1. Princip metode

Metoda se zasniva na činjenici da kvasac *S. cerevisiae* fermentira saharozu pri čemu nastaje ugljikov (IV) oksid.



Fermentacija se događa u hermetički zatvorenim fermentacijskim bočicama koje sadržavaju tekući hranjivi medij. Za vrijeme fermentacije proizvodi se plin koji u otvorenu štrcaljku istiskuje ekvivalentan volumen tekućine. Mjerenjem volumena istisnute tekućine količina proizvedenog plina za vrijeme fermentacije te intenzitet same fermentacije se procjenjuju indirektno.

3.2.1.2. Postupak

Tekuća hranjiva podloge za YTT priređena je otapanjem 4,0 g saharoze, 2,0 g peptona i 1,7 g ekstrakta kvasca u 100 ml destilirane vode.

pH vrijednost podešena je na $7,0 \pm 0,2$.

Volumen 4 ml medija se dispergira u staklenim bočicama od 24 ml te se hermetički začepi gumenim čepom te aluminijskom navlakom prije autoklaviranja na 121 °C 15 min.

Prethodno je soj kvasca *S. cerevisiae* ATCC 64252 uzgojen na krutom YM agaru (Difco 0712) prema danoj recepturi (Tablica 1) te je čista kultura umnožena kroz 10 – 12 sati na $30,0 \pm 0,1$ °C, da bismo dobili stanice u log fazi rasta.

Tablica 1. Receptura za pripremu krutog Yeast Medium

Ekstrakt kvasca	3,0 g
Ekstrakt sladi	3,0 g
Pepton iz sojina zrna	5,0 g
Glukoza	10,0 g
Agar	15,0 g
Destilirana voda	1000,0 ml

pH vrijednost podešena je na $7,0 \pm 0,2$.

Suspenzija kvasca napravljena je na slijedeći način:

Pomoću bakteriološke ušice i između dvije vatre s plamenika, s krute podloge uzima se kvasac, na način da se 10 nanosa pomoću bakteriološke ušice razmuti u 10 ml fiziološke otopine (destilirana voda s dodatkom 0,3 % NaCl) u epruveti od 15 ml. Zatim se ta suspenzija kvasca dobro homogenizira na 30 Hz pomoću električne miješalice – homogenizatora (Techno KARTELL TK3S). Homogenizacija se može izvesti i snažnim ručnim protresanjem. Gustoća stanične suspenzije podešena je na apsorbanciju 3,0 pri 550 nm, u usporedbi s destiliranom vodom i to pomoću spektrofotometra HACH DR/2500.

Uzorci komercijalnih surfaktanata obično dolaze u obliku praška ili pasti, pa je bilo potrebno pripremiti njihove otopine na način da se u tikvicama otopi određena izvagana količina praška ili paste svakog pojedinog surfaktanta u 70 ml fiziološke otopine.

Zatim se pH vrijednosti pomoću pH-metra WTW pH 330m podese na vrijednost između 6 i 8 pomoću 2M otopine HCl i 1M otopine NaOH, nakon čega se tikvica dopuni fiziološkom otopinom do 100 ml.

Nakon toga je izvršeno razrjeđivanje otopina destiliranom vodom (uz pomoć menzura od 100 ml) na ostale potrebne koncentracije (Tablica 2).

Tablica 2. Testne koncentracije surfaktanata

Komercijalno ime	Testne koncentracije za kvasac (g/L)
Kutriacid 95A	1/ 0.1/ 0.05/ 0.01
Ethomeen T/15	1/ 0.1/ 0.01/ 0.005/ 0.001
Oxidet DM-4	1/ 0.1/ 0.01
Arlypon VPC	1/ 0.1/ 0.01/ 0.005/ 0.001
Servamine KOO 330	1/ 0.5/ 0.1/ 0.05/ 0.01
Empilan KI 8	10/ 5/ 1/ 0.1
Lutensit TC-EHS	20/ 10/ 5/ 1/ 0.1
Genapol PF 20	20/ 10/ 5
Na-Cumolsulfonat 40	20/ 10/ 5
Texapon LS 35	1/ 0.1/ 0.01
Hostapur SAS 60	10/ 5/ 2.5/ 1
Solfodac AC-3-I	1/ 0.1/ 0.01/ 0.005/ 0.001
SDS (Na-dodecil sulfat)	1/ 0.5/ 0.1/ 0.05/ 0.01
N-Hexadecylpyridinium chloride	1/ 0.1/ 0.01/ 0.005/ 0.001
N-Dodecylpyridinium chloride	1/ 0.1/ 0.05/ 0.01

Zatim slijedi naciepljivanje kvasaca u fermentacijske bočice, te dodavanje otopina ispitivanih surfaktanata u različitim razrijeđenim koncentracijama.

U svaku bočicu s hranjivim medijem, naciepi se po 0,5 ml suspenzije kvasca, uz pomoć injekcijske štrcaljke (od 2 ml) i igle (1,2x40; 18G, dužine 5 cm).

Jednu bočica, koja će poslužiti kao kontrola, nakon dodatka 0,5 ml suspenzije kvasca do vrha se dopuni destiliranom vodom.

Ostale fermentacijske bočice (također s hranjivim medijem i s naciepljenom suspenzijom kvasca) do vrha se dopune ispitivanim koncentracijama uzoraka.

Punjenje bočica destiliranom vodom, odnosno ispitivanim koncentracijama uzoraka, vrši se injekcijskom štrcaljkom (od 20 ml) i iglom (1,2x40; 18G, dužine 5 cm), uz pomoć još jedne takve igle iz koje izlazi zrak i na koju se, po završetku punjenja bočice, stavlja graduirani injekcijski cilindar bez klipa (štrcaljka od 10 ml), a sama igla se uranja do kraja bočice (Slika 16).



Slika 16. Punjenje fermentacijskih bočica uzorkom, potrebne su 2 igle.

Tako pripremljene bočice, stavljene su u termostatski inkubator, gdje su inkubirane 16 sati na temperaturi od $28,0 \pm 0,1$ °C.

Nakon isteka vremena inkubacije, očitava se volumen istisnute tekućine u graduiranom injekcijskom cilindru, koju je iz začepljene bočice kroz iglu istisnuo razvijeni plin prilikom fermentacije saharoze. Volumen istisnute tekućine ekvivalentan je volumenu nastalog plina.

3.2.1.3. Izražavanje rezultata

Očitani volumen plina u usporedbi s kontrolom koristi se za računanje postotka inhibicije:

$$\% I = \frac{V_{\text{KONTROLA}} - V_{\text{UZORAK}}}{V_{\text{KONTROLA}}} \times 100$$

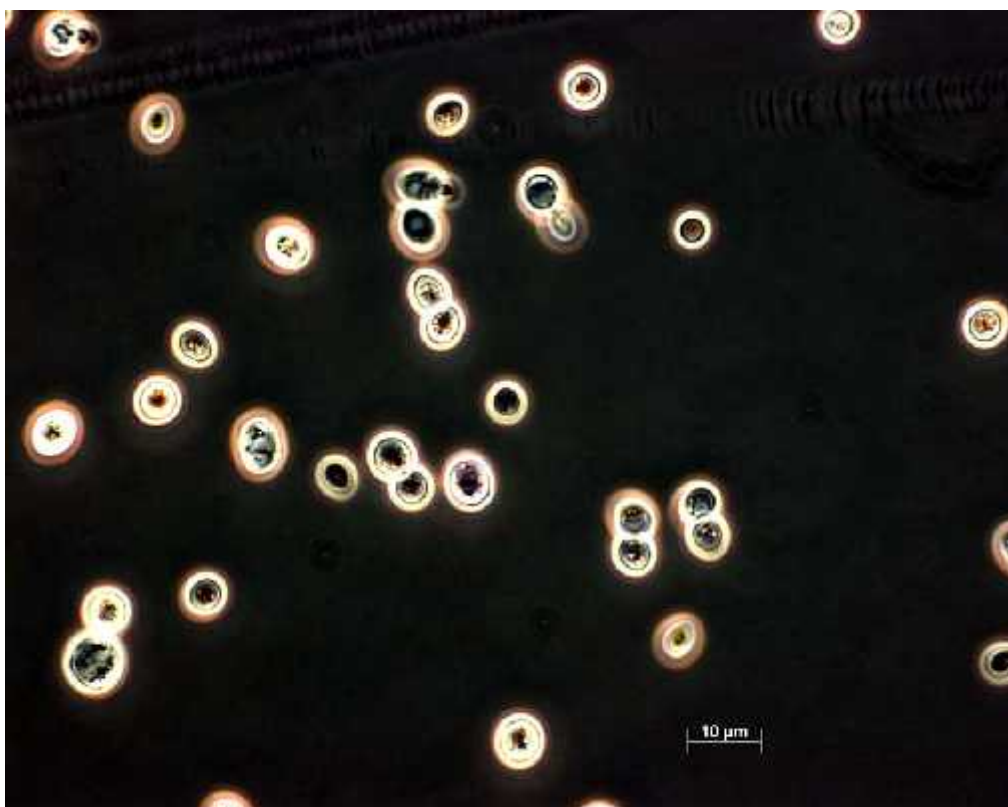
Iz krivulje ovisnosti postotka inhibicije fermentacije saharoze o koncentraciji ispitnog materijala (inhibicijska krivulja) odredi/interpolira se koncentracija koja inhibira fermentaciju saharoze za 50% (EC_{50}).

U tu je svrhu korišten program Statistica (2001) koji je korišten i za statističku obradu dobivenih podataka.

3.2.2. Utvrđivanje toksičnosti testom metilenskog modrila na kvascu *S. cerevisiae*

3.2.2.1. Princip metode

Metoda se zasniva na činjenici da nakon uginuća stanice ili njenog fiziološkog slabljenja pod utjecajem neke toksične tvari, u ovom slučaju određene koncentracije surfaktanta, te su mrtve ili fiziološki oslabljene stanice kvasca pod svjetlosnim mikroskopom vidljive kao plave za razliku od živih stanica koje su vidljive kao bijele, odnosno nebojene (Slika 17).



Slika 17. Stanice *S. cerevisiae* obojene metilenskim modrilom. Vide se plave (mrtve) i bijele (žive) stanice.

3.2.2.2. Postupak

Čistu kulturu *S. cerevisiae* umnoži se kroz 10 - 12 h / $30,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ na krutom Yeast Medium pripremljenom prema već spomenutoj recepturi (Tablica 1).

Kultura je umnožena prethodni dan kako bi slijedeće jutro dostigla log fazu rasta stanica, odnosno bila spremna za slijedeći korak.

Gusta suspenzija kvasca u destiliranoj vodi s dodatkom 0,3 % NaCl priređena na isti način kao i za fermentacijski test te je podešena na apsorbanciju $A = 3,0$ pri 550 nm. pomoću HACH spektrofotometra DR/2500. Sve zajedno je homogenizirano na homogenizatoru Techno KARTELL TK3.

Otopina metilen plavog pripremljena je na slijedeći način:

Tri tablete metilen plavog otopljene su u 100 ml destilirane vode, na temelju čega je dobivena 0,03% otopina metilen plavog. Ona je zatim profiltrirana kroz membranski filter promjera pora $0,2\ \mu\text{m}$ te je tako dobivena otopina koja će se kasnije koristiti za bojenje stanica kvasca. Sterilna otopina je prije uporabe pohranjena u hladnjaku.

Prethodno je potrebno prirediti kontrolu na način da se u epruvetu odpipetira 9 ml sterilne destilirane vode s dodatkom 0,3 % NaCl. Takvoj otopini doda se 1 ml kvasca, te se sve zajedno homogenizira. Na taj način dobili smo izotoničnu otopinu koja ima neutralan utjecaj na kvasac tj. niti je hranjiva, niti toksična.

U ostale je epruvete otpipetirano po 9 ml otopine ispitivanog surfaktanta određene koncentracije te 1 ml suspenzije kvasca. Sve zajedno je homogenizirano na homogenizatoru (može se i začepljeno protresti u ruci) te je pohranjeno 15 min u termostatu na temp. $28,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Nakon toga slijedi mikroskopiranje.

Na predmetno stakalce kapne se 1 kap odnosno $5\ \mu\text{l}$ uzorka, te 1 kap ($5\ \mu\text{l}$) ranije pripremljene otopine metilen plavog. Sve se pokrije pokrovnim stakalcem te se nakon 1 min promatra pod mikroskopom na srednjem povećanju (40x). U ovome istraživanju korišten je mikroskop Olympus CX21.

Brojanje se vrši na način da se uz pomoć ručnog brojača broji 100 ili više stanica, a broje se mrtve (plave) i žive (bije) stanice kvasca.

3.2.2.3. Izražavanje rezultata

Postotak inhibicije određuje se na slijedeći način.

U 100 izbrojenih stanica odredi se broj plavih (mrtvih) i bijelih (živih) stanica. Od broja mrtvih oduzme se broj mrtvih u kontroli te se sve podijeli s brojem mrtvih stanica prema formuli:

$$\% I = \frac{\text{BROJ MRTVIH STANICA} - \text{BROJ MRTVIH STANICA U KONTROLI}}{\text{BROJ MRTVIH STANICA}} \times 100$$

Nacrta se krivulja ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji ispitivanog uzorka. Iz krivulje se odredi/interpolira vrijednost EC₅₀ tj. ona koncentracija kemikalije koja je letalna za 50 % organizama u ispitivanom uzorku u odnosu na kontrolni uzorak.

U tu svrhu također je korišten kompjuterski program Statistica (2001).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

U ovome radu pomoću dva testa (test fermentacije, akutni test toksičnosti metilenskim modrilom) ispitivana je toksičnost 15 komercijalnih surfaktanata.

Dobivene EC₅₀ vrijednosti u oba testa, kao i vrijednosti standardne devijacije te koeficijenta varijacije prikazane su u tablicama 3. i 4.

Tablica 3. Srednja EC₅₀ vrijednost za surfaktante u testu fermentacije. SD = standardna devijacija, CV = koeficijent varijacije (%).

Surfaktant	EC ₅₀ (mg/L)	SD	CV
Kutriacid 95A	80,0	10,0	12,50
Ethomeen T/15	3,0	0,2	6,90
Oxidet DM-4	68,0	8,0	11,76
Arlypon VPC	3,7	0,6	16,22
Servamine KOO 330	71,0	0,0	2,82
Empilan KI 8	-	-	-
Lutensit TC-EHS	-	-	-
Genapol PF 20	-	-	-
Na-Cumolsulfonat	-	-	-
Texapon LS 35	400,0	20,0	4,88
Hospatur SAS 60	1520,0	60,0	3,95
Solfodac AC-3-I	10,0	0,0	14,29
SDS	135,0	5,0	3,70
N-hexadecylpyridinium	52,0	2,0	3,85
N-dodecylpyridinium	26,0	3,0	11,54

Tablica 4. Srednja EC₅₀ vrijednost za različite surfaktante u testu metilenskim modrilom.
SD = standardna devijacija CV = koeficijent varijacije (%).

Surfaktant	EC ₅₀ (mg/L)	SD	CV
Kutriacid 95A	50,0	10,0	20,00
Ethomeen T/15	3,0	1,0	33,33
Oxidet DM-4	7,0	1,0	14,29
Arlypon VPC	4,3	0,3	6,98
Servamine KOO 330	7,7	1,2	15,58
Empilan KI 8	7800,0	1,2	15,38
Lutensit TC-EHS	2000,0	500,0	25,00
Genapol PF 20	8500,0	400,0	4,71
Na-Cumolsulfonat	-	-	-
Texapon LS 35	70,0	20,0	28,57
Hospatur SAS 60	1900,0	400,0	21,05
Solfodac AC-3-I	6,0	2,0	33,33
SDS	110,0	30,0	27,27
N-hexadecylpyridinium	19,0	5,0	26,32
N-dodecylpyridinium	70,0	10,0	14,29

Iz priloženih tablica vidljivo je da od 15 ispitivanih uzoraka u testu fermentacije 4 ispitivana uzorka imaju vrijednost EC₅₀ veću od 100 mg/L, dok u testu metilenskim modrilom vrijednost EC₅₀ veću od 100 mg/L ima 5 ispitivanih uzoraka.

Vrijednost EC_{50} u testu fermentacije varira od 3,0 mg/L za Ethomeen T/15, te se on smatra najtoksičnijim, do najveće zabilježene EC_{50} vrijednosti kod Hospatura SAS 60 od 1520,0 mg/L.

Rezultati se poklapaju s testom metilenskog modrila gdje je najmanja EC_{50} vrijednost zabilježena također kod Ethomeena T/15, te je također iznosila 3,0 mg/L, dok su vrlo visoke EC_{50} vrijednosti izmjerene kod Empilana KI 8, ($EC_{50} = 7800,0$ mg/L), zatim Lutensita ($EC_{50} = 2000,0$ mg/L), te Genapola ($EC_{50} = 8500,0$ mg/L) što je ujedno bila i najviša izmjerena EC_{50} vrijednost.

Za tri spomenuta surfaktanta (Empilan KI 8, Lutensit TC-EHS i Genapol PF 20) u testu fermentacije uopće nisu izmjerene EC_{50} vrijednosti, što ukazuje da surfaktanti nisu bili toksični, fermentacija je normalno tekla.

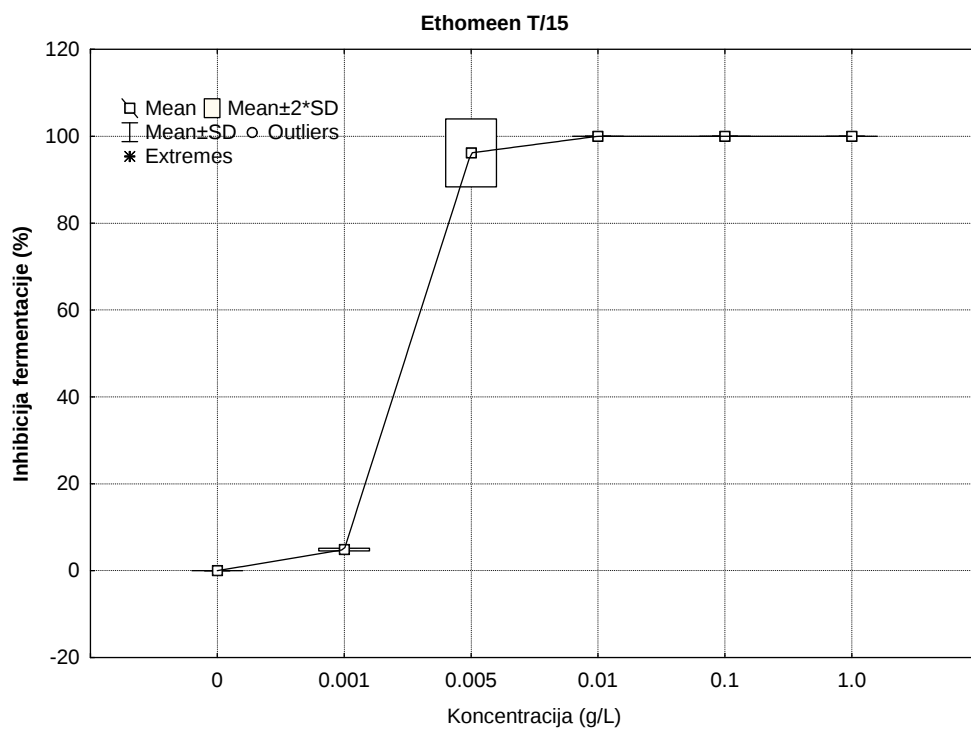
Za Na-Cumolsulfonat 40 ni u jednom testu nisu izmjerene EC_{50} vrijednosti što ukazuje na to da taj surfaktant uopće nije toksičan.

Iz priloženih tablica može se također vidjeti da se koeficijent varijacije u testu fermentacije kreće od 2,82% za Servamine KOO 330 do 16, 22% za Arlypon VPC, s prosječnom vrijednošću od 8,40%.

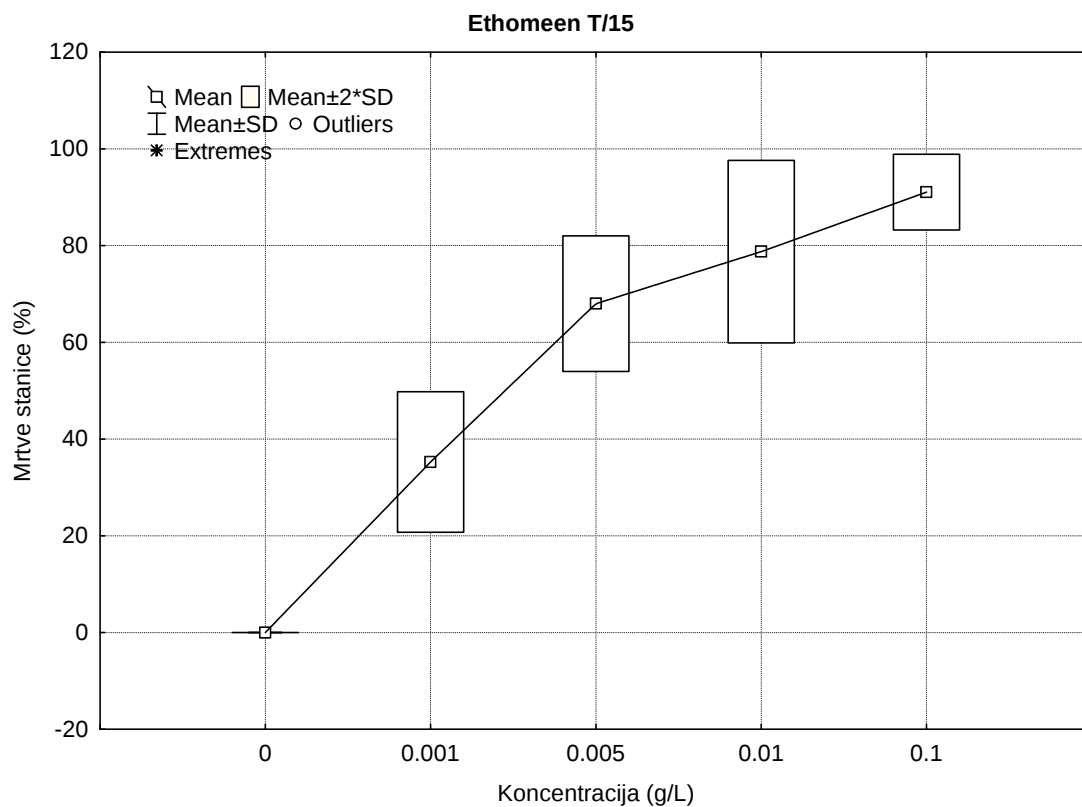
Koeficijent varijacije u testu metilenskog modrila je nešto veći te ide od 4,71% za Genapol PF 20 do 33,33% za Ethomeen T/15 te Solfodac AC-3-I, s prosječnom vrijednošću 20,44%.

U daljnjem tekstu dani su grafički prikazi odnosa inhibicije u testu fermentacije i testu metilenskim modrilom za svih 15 ispitivanih uzoraka, i to prema rastućoj EC_{50} vrijednosti.

Ethomeen T/15 sa vrijednošću EC_{50} od 3 mg/L u fermentacijskom (Slika 18.) i u testu metilenskim modrilom (Slika 19).



Slika 18. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Ethomeen T/15 u testu fermentacije. $EC_{50} = 3,0$ mg/L.

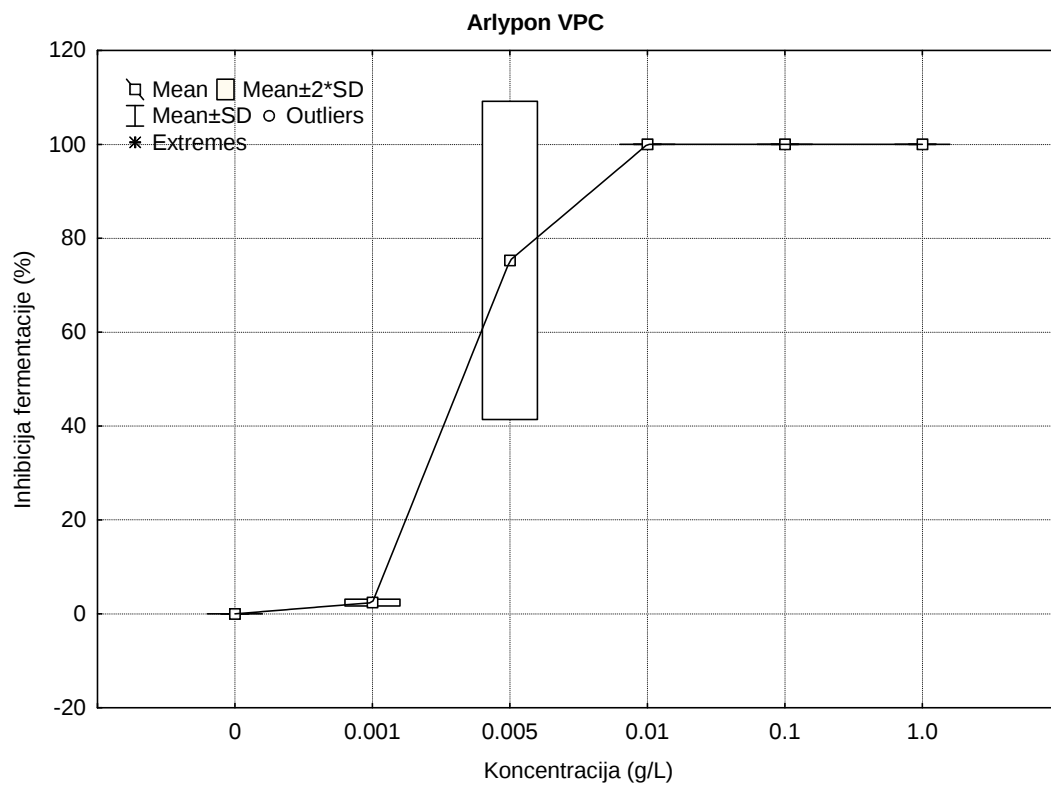


Slika 19. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Ethomeen T/15 u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 3,0 \text{ mg/L}$.

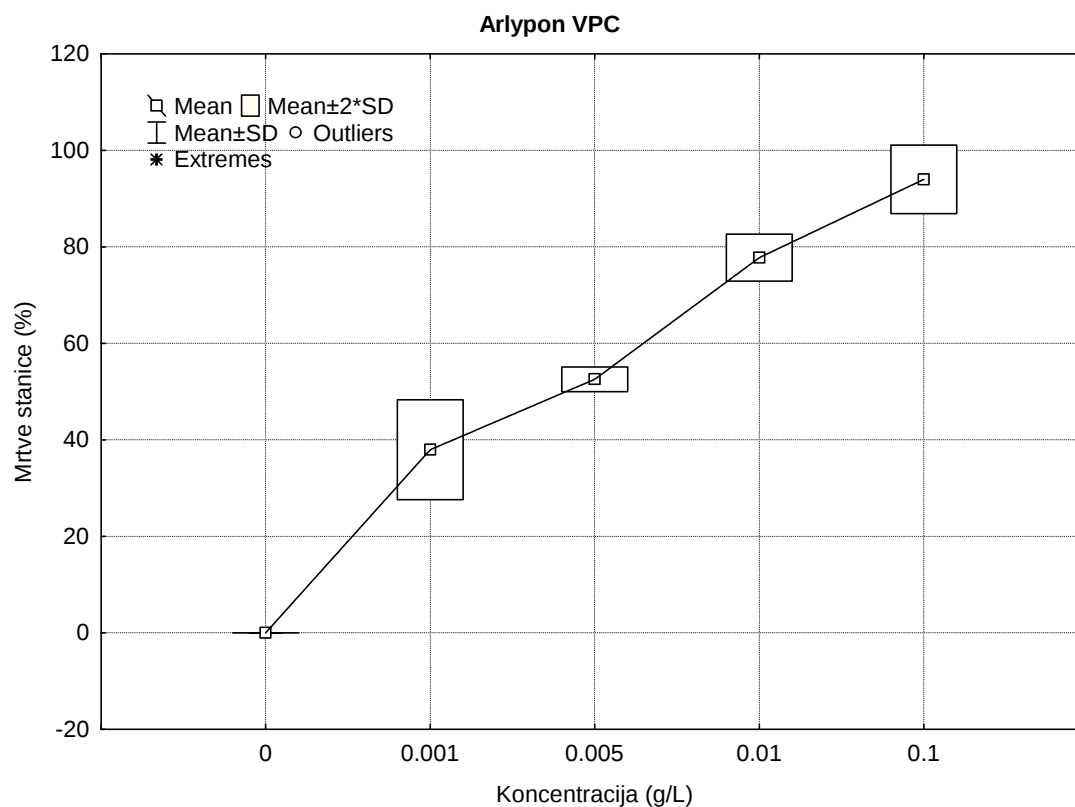
Iz priloženih grafičkih prikaza vidljiva je izrazito velika podudarnost između dva testa, te je i u testu fermentacije (Slika 18) i u testu toksičnosti metilenskim modrilom (Slika 19) izmjerena ista EC_{50} vrijednost za Ethomeen T/15, koja je iznosila $3,0 \text{ mg/L}$.

Sljedeći surfaktant po EC_{50} vrijednosti je:

Arlypon VPC s izmjerenom vrijednošću EC_{50} od 3,7 mg/L u fermentacijskom (Slika 20) te vrijednošću $EC_{50} = 4,3$ mg/L u testu metilenskog modrila (Slika 21).



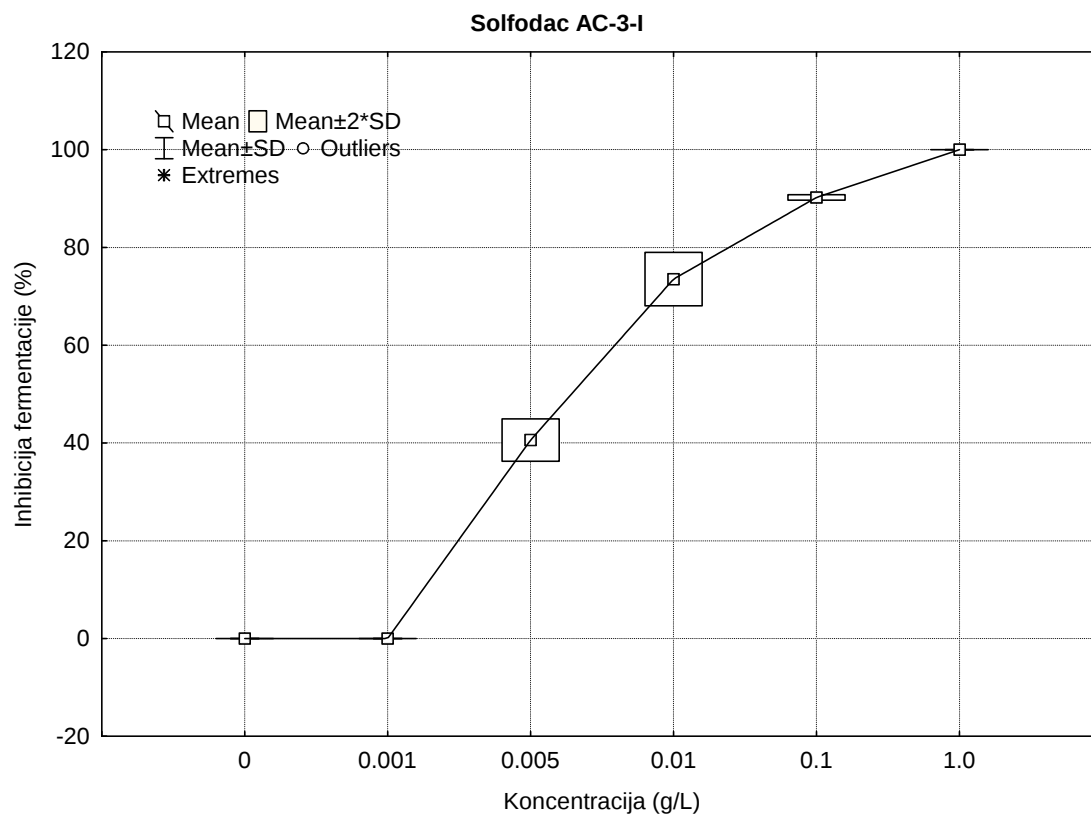
Slika 20. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Arlypon VPC u testu fermentacije. $EC_{50} = 3,7$ mg/L.



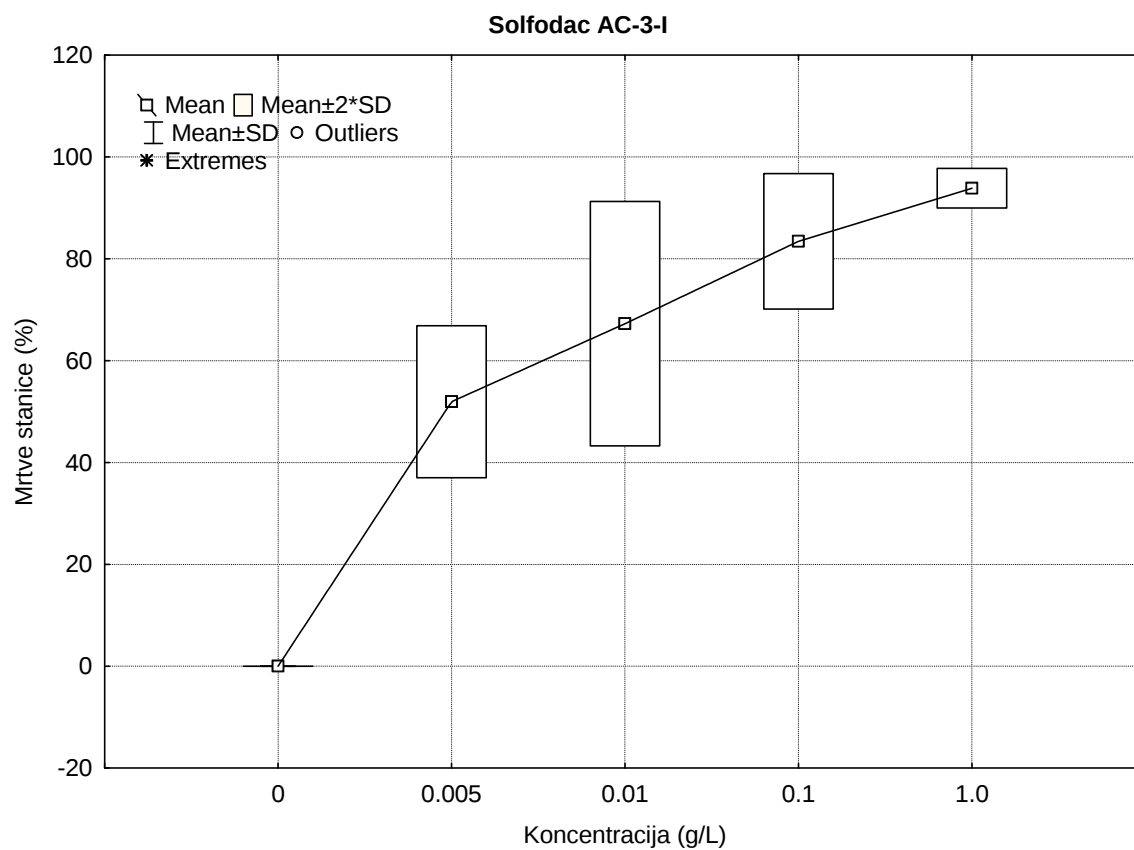
Slika 21. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Arlypon VPC u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 4,3 \text{ mg/L}$.

Iz priloženih grafičkih prikaza također je vidljiva podudarnost rezultata testa fermentacije (Slika 20) s rezultatima testa metilenskog modrila (Slika 21).

Slijedi **Solfodac AC- 3-I** s izmjerenom EC_{50} vrijednošću od 10,0 mg/L u fermentacijskom testu (Slika 22) , te 6,0 mg/L u testu metilenskog modrila (Slika 23).

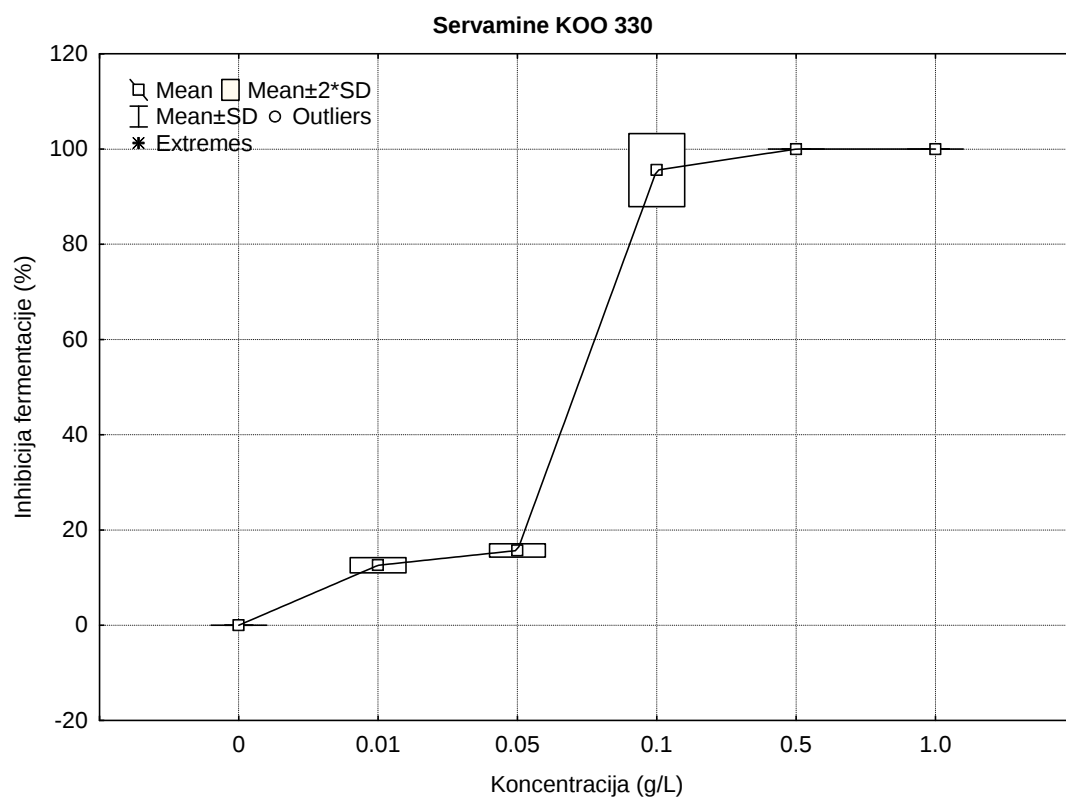


Slika 22. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Solfodac AC-3-I u testu fermentacije. $EC_{50} = 10,0$ mg/L.

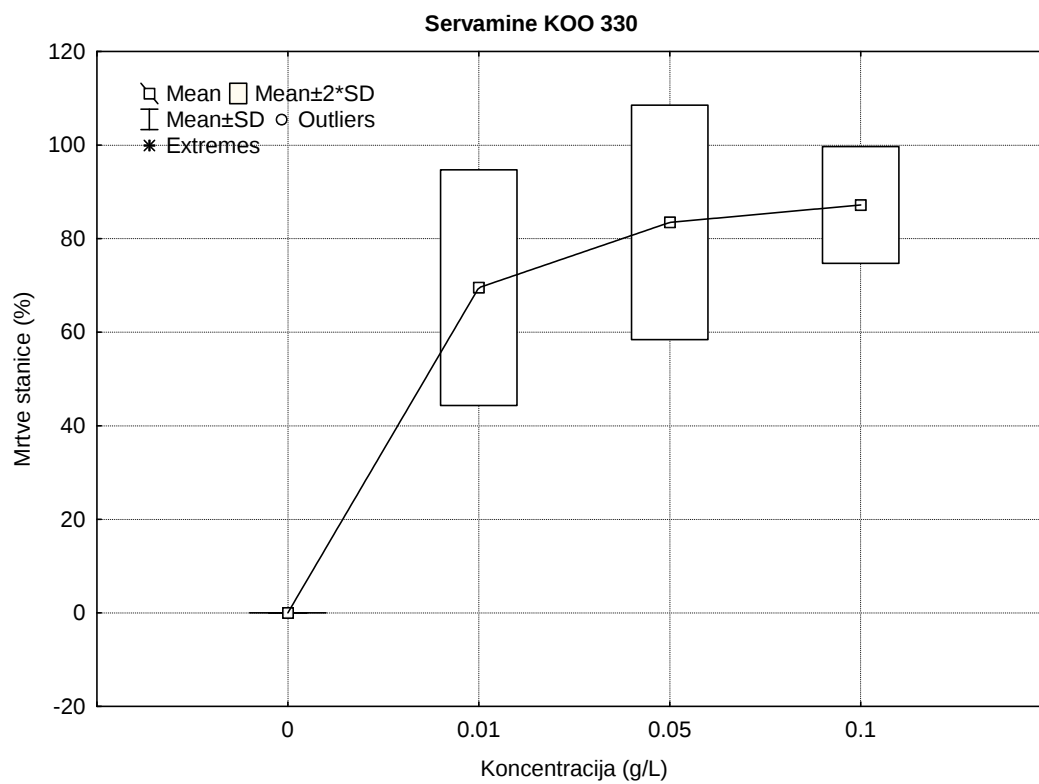


Slika 23. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Solfodac AC-3-I u testu metilenskog modrila.
 $EC_{50} = 6,0 \text{ mg/L}$.

Servamine KOO u fermentacijskom testu postigao je vrijednost EC_{50} od 71,0 mg/L (Slika 24), dok je u testu metilenskog modrila EC_{50} vrijednost iznosila 7,7 mg/L (Slika 25).



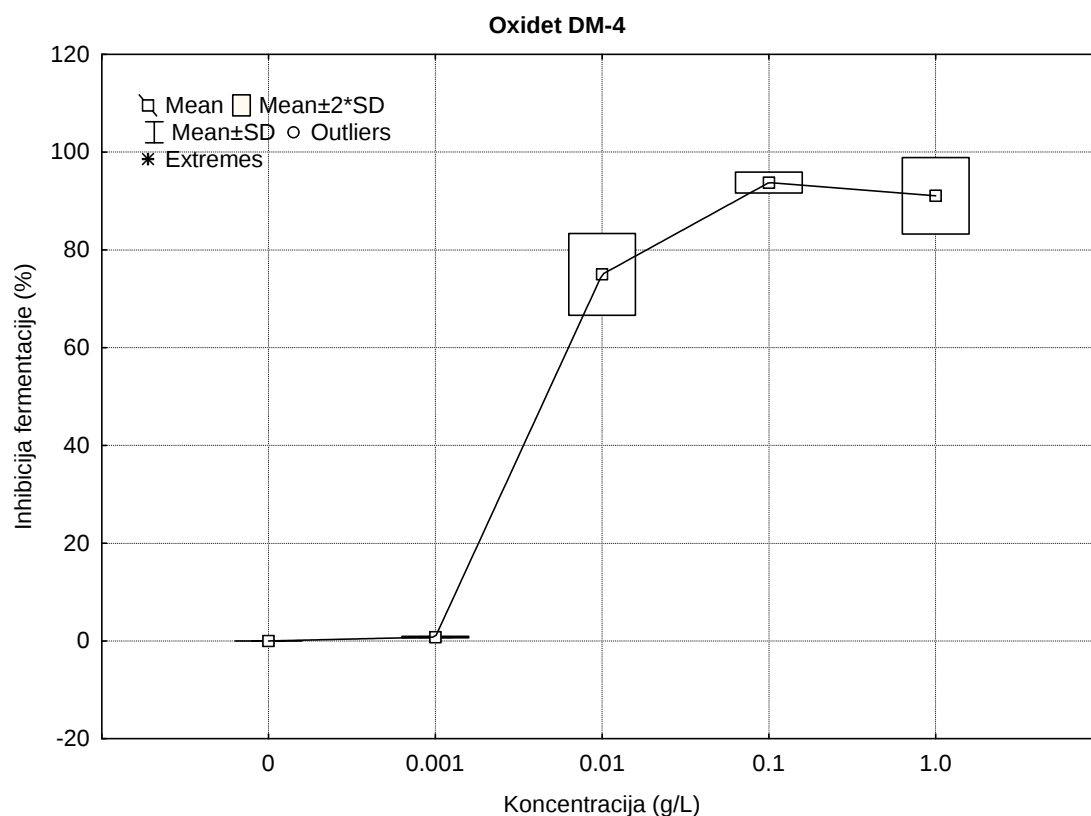
Slika 24. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Servamine KOO 330 u testu fermentacije.
 $EC_{50} = 71,0$ mg/L.



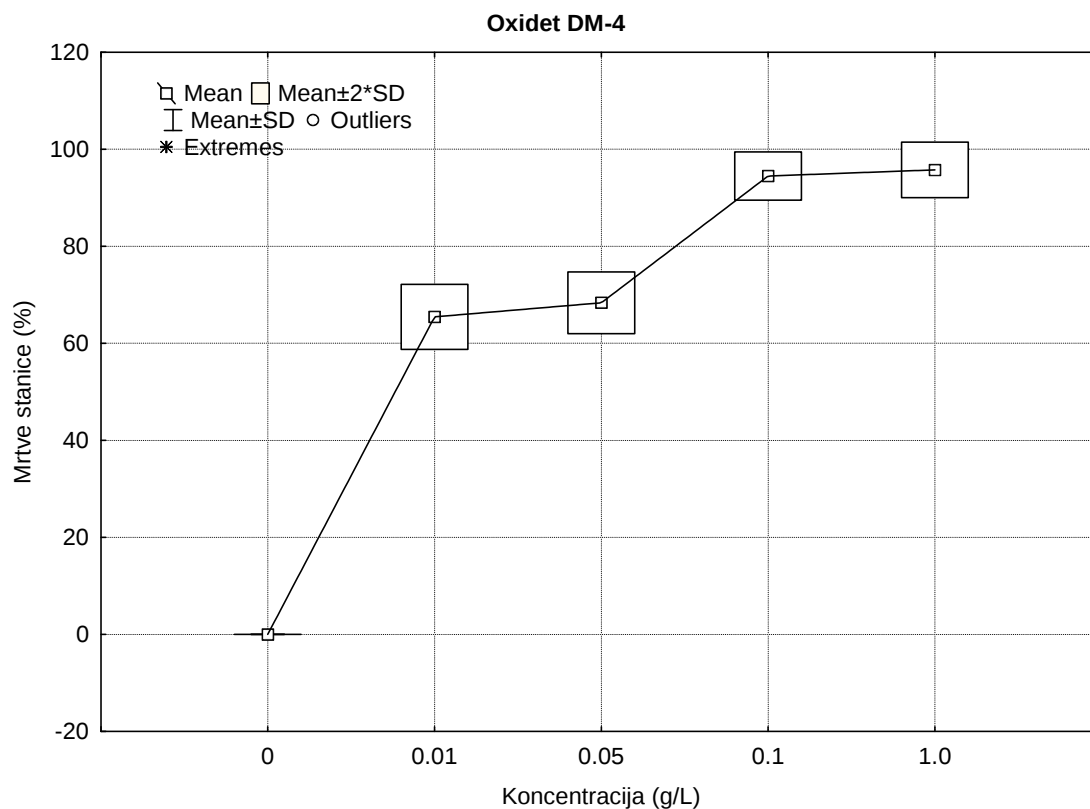
Slika 25. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Servamine KOO 330 u testu metilenskim modrilom. $EC_{50} = 7,7$ mg/L.

Sljedeći surfaktant koji je dao različite rezultate u testu fermentacije i testu metilenskim modrilom bio je

Oxidet DM 4 s vrijednošću EC_{50} od 68,0 mg/L u fermentacijskom (Slika 26) te 7,0 mg/L u testu metilenskog modrila (Slika 27).



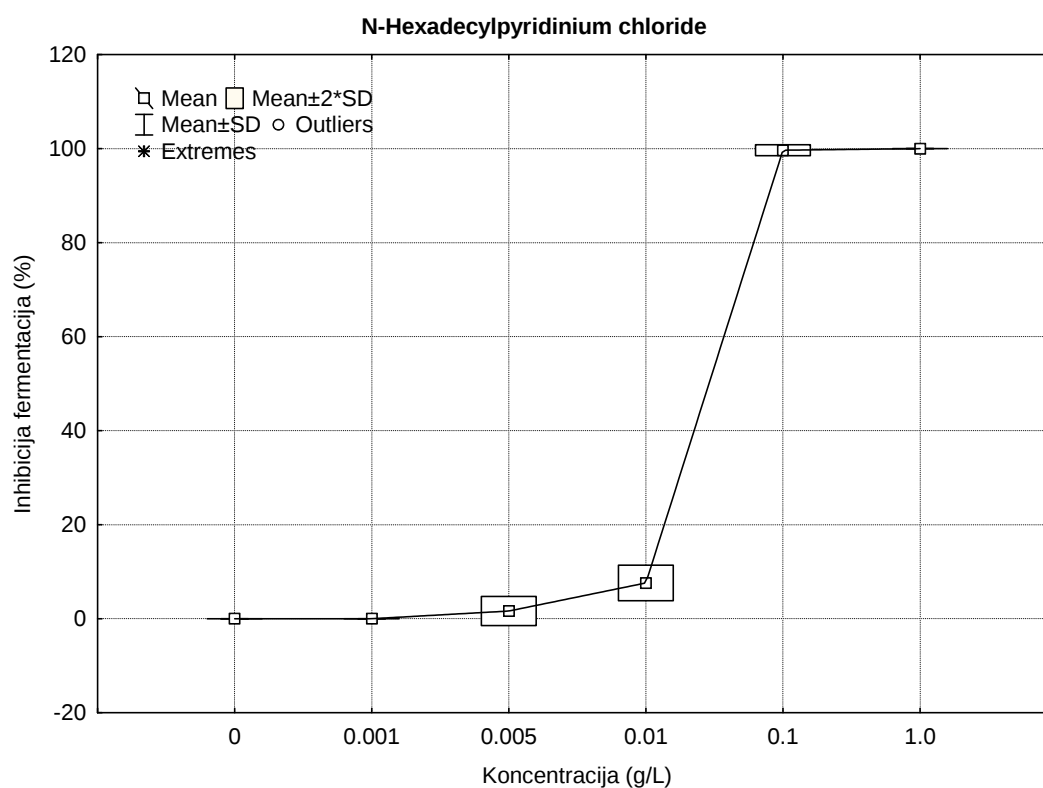
Slika 26. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Oxidet DM 4 u testu fermentacije. $EC_{50} = 68,0$ mg/L.



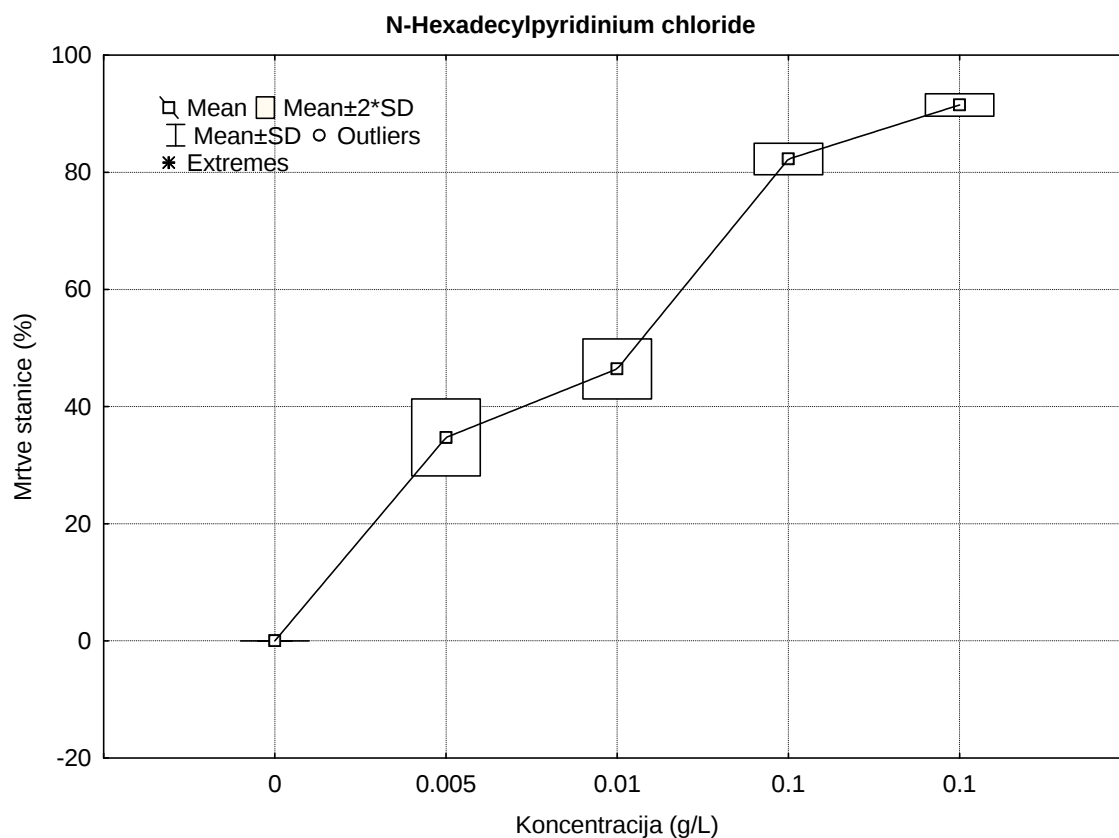
Slika 27. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Oxidet DM 4 u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 7,0 \text{ mg/L}$.

Iz priloženih grafičkih prikaza vidljivo je da je u fermentacijskom testu (Slika 26) EC_{50} vrijednost za Oxidet DM 4 bila 68,0 mg/L , što odudara od rezultata u testu metilenskog modrila gdje je EC_{50} vrijednost bila znatno niža, i to 7,0 mg/L (Slika 27).

Slijedi surfaktant **N – hexadecylpyridinium chloride** s EC_{50} vrijednošću 52,0 mg/L u fermentacijskom testu (Slika 28) te 19,0 mg/L u testu metilenskog modrila (Slika 29).



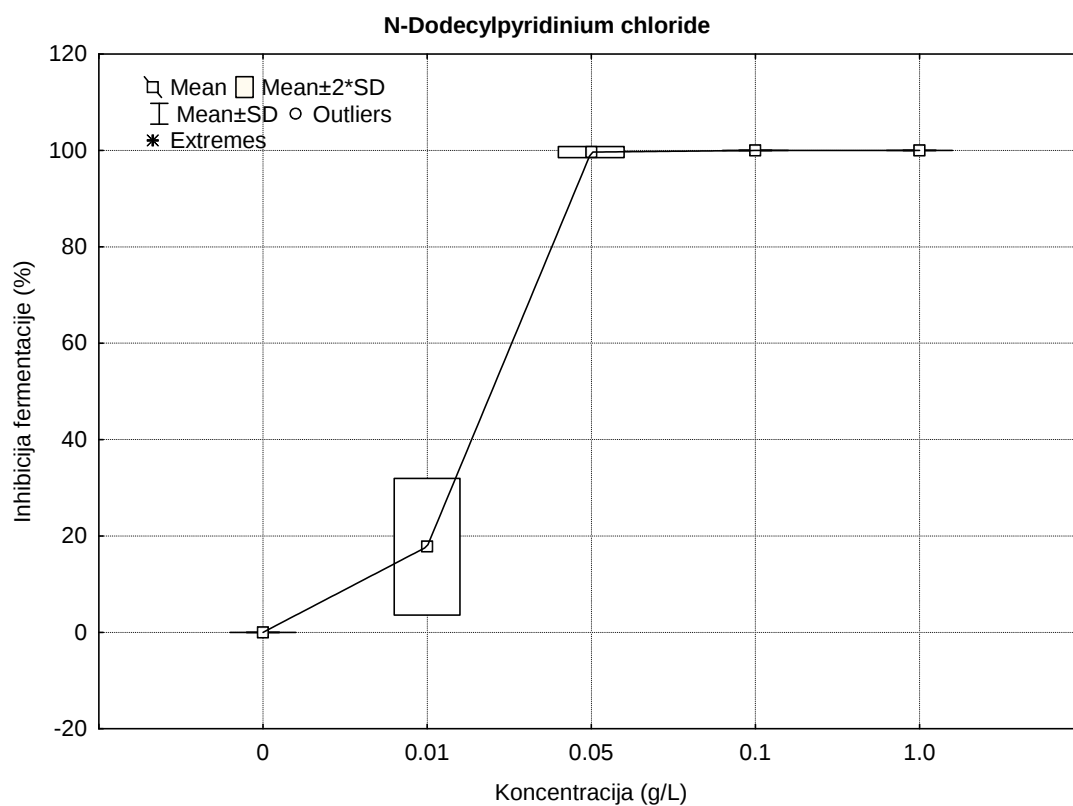
Slika 28. Grafički prikaz odnosa inhibicije za N – hexadecylpyridinium chloride u testu fermentacije. $EC_{50} = 52,0$ mg/L.



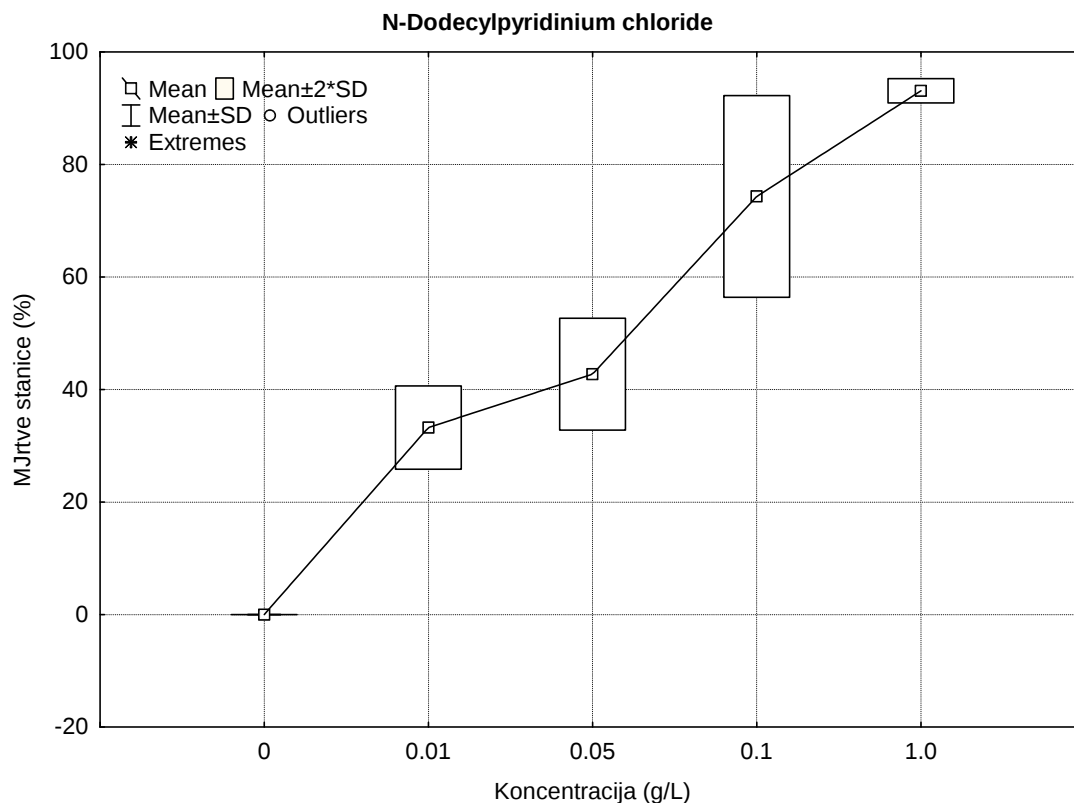
Slika 29. Grafički prikaz odnosa inhibicije za N-Hexadecylpyridinium chloride u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 19,0$ mg/L.

Iz priloženih grafičkih prikaza vidljivo je da je za N - hexadecylpyrimidinium chloride u testu fermentacije (Slika 28) postignuta nešto viša EC_{50} vrijednost, 52,0 mg/L od vrijednosti EC_{50} postignute u testu metilenskim modrilom (Slika 29) gdje je ta vrijednost bila 19,0 mg/L, što ponovno ukazuje na veću osjetljivost testa metilenskim modrilom.

Po rastućoj EC_{50} vrijednosti slijedi **N– dodecylpyridinium chloride** s EC_{50} vrijednošću 26,0 mg/L u fermentacijskom (Slika 30) i 70,0 mg/L u testu metilenskog modrila (Slika 31).



Slika 30. Grafički prikaz odnosa inhibicije za N – Dodecylpyridinium chloride u testu fermentacije. $EC_{50} = 26,0$ mg/L.

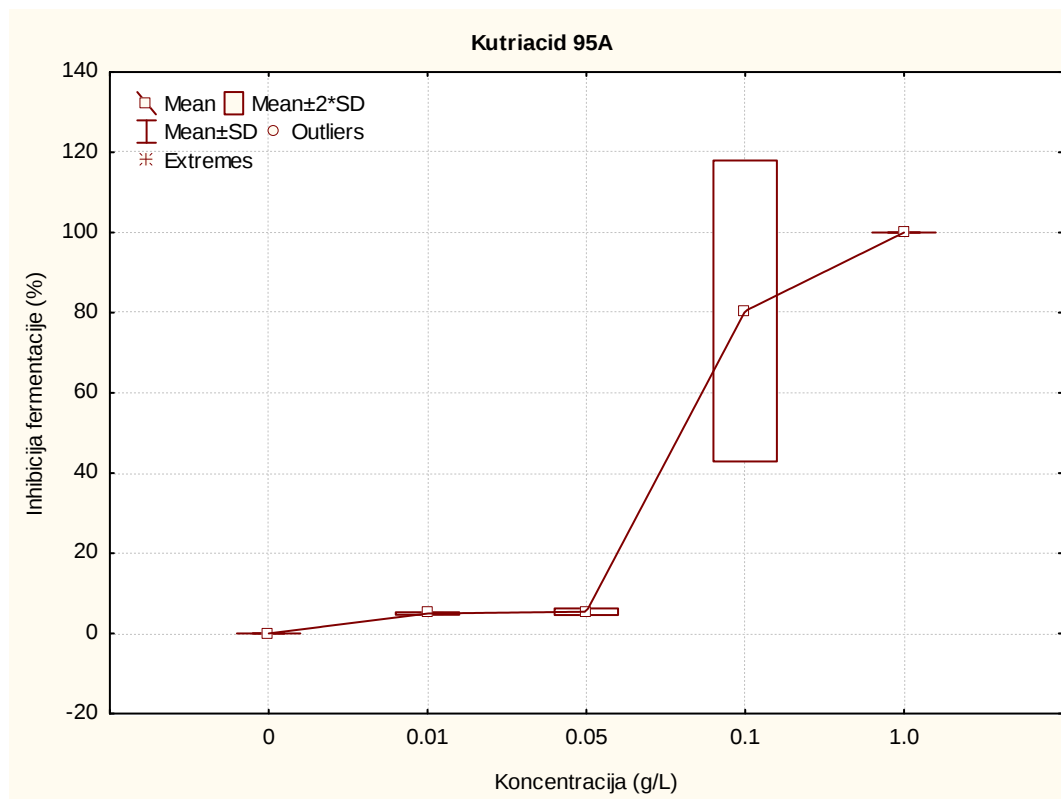


Slika 31. Grafički prikaz odnosa inhibicije za N – Dodecylpyridinium chloride u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 70 \text{ mg/L}$.

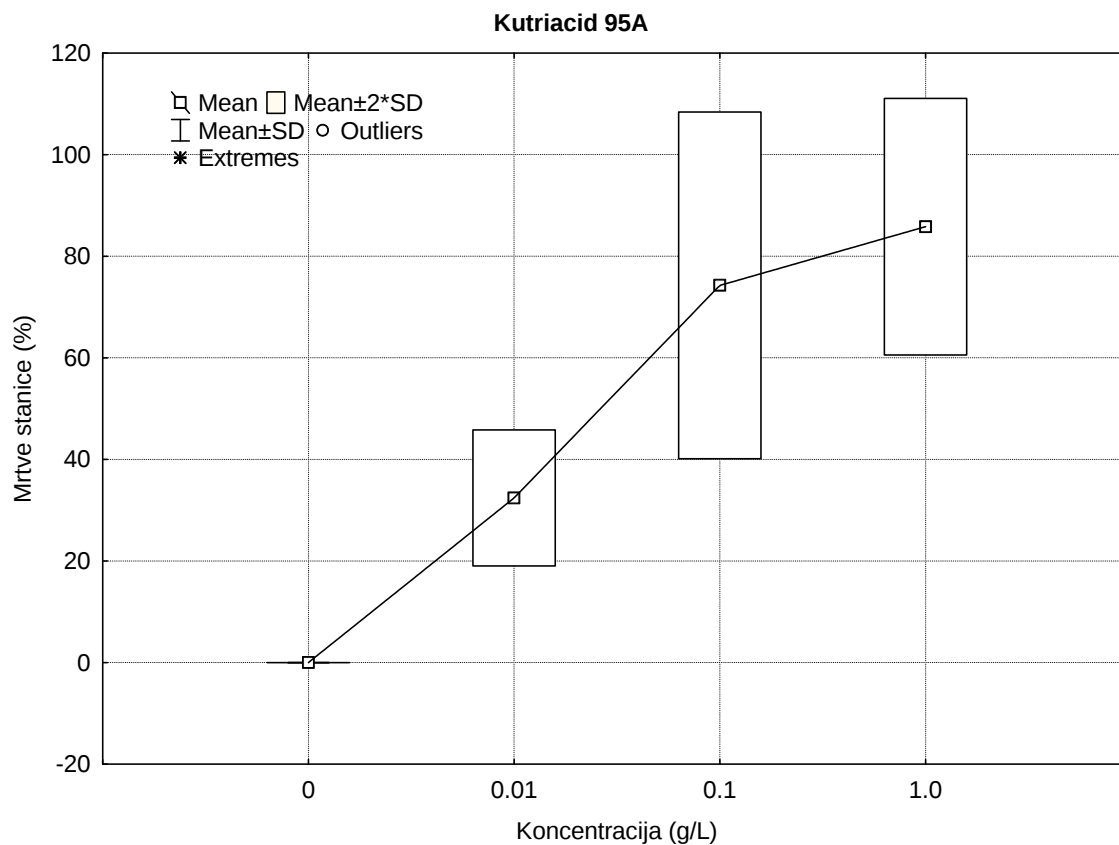
Za razliku od N- Hexadecylpyridinium chloride-a gdje niža EC_{50} vrijednost izmjerena u testu metilenskim modrilom (Slika 29), kod N – Dodecylpyridinium chloride-a slučaj je obrnut, pa je tako u fermentacijskom testu (Slika 30) izmjerena niža EC_{50} vrijednost koja je iznosila 26,0 mg/L, od vrijednosti EC_{50} izmjerene u testu metilenskog modrila gdje je ona iznosila 70,0 mg/L (Slika 31).

To objašnjavam činjenicom da je pri koncentraciji od 26,0 mg/L u fermentacijskom testu 50% kvasaca izgubilo sposobnost fermentacije, ali pritom nije uginulo, pa je u testu metilenskog modrila za smrtnost 50% populacije bila potrebna veća koncentracija surfaktanta.

Komercijalni surfaktant **Kutriacid 95 A** u fermentacijskom testu postigao je EC_{50} vrijednost 80,0 mg/L (Slika 32) dok je u testu metilenskog modrila ta vrijednost bila 50,0 mg/L (Slika 33).



Slika 32. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Kutriacid 95 A u testu fermentacije. $EC_{50} = 80$ mg/L.

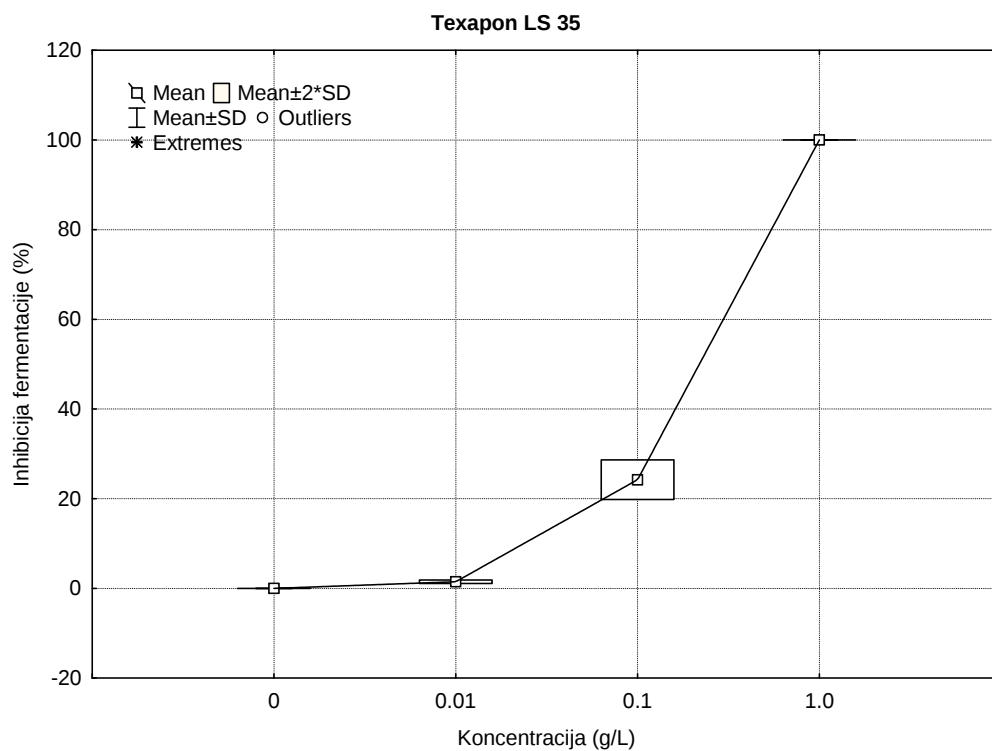


Slika 33. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Kutriacid 95 A u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 50 \text{ mg/L}$.

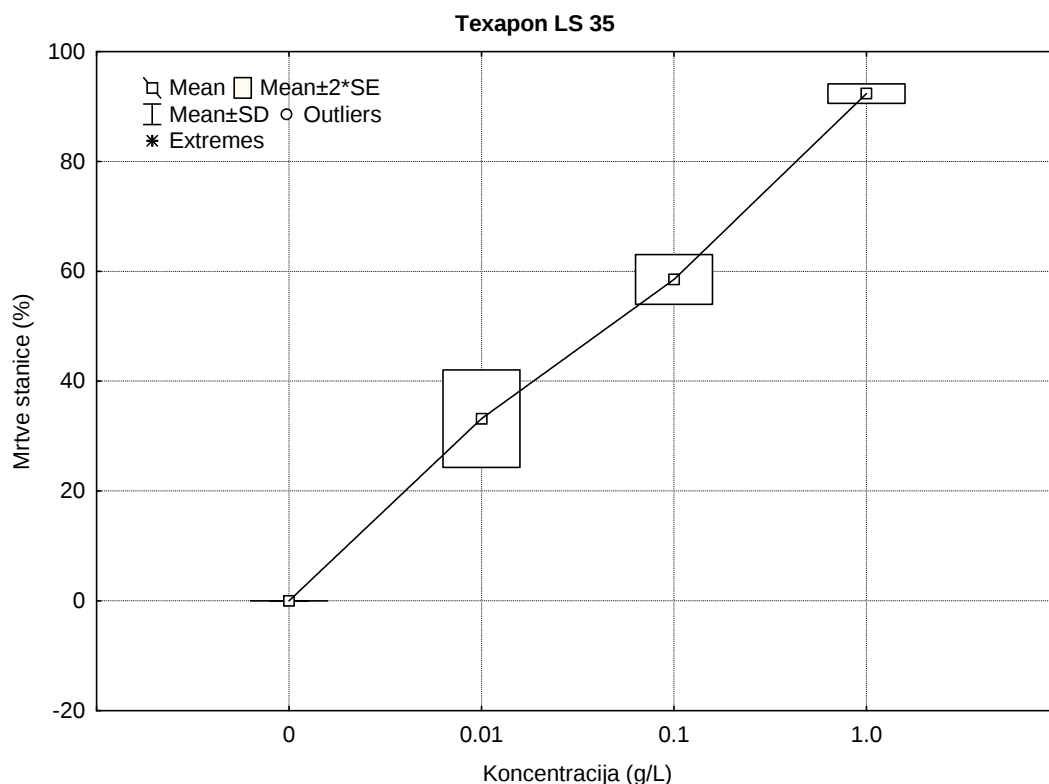
Iz priloženih grafičkih prikaza vidljivo je da su oba testa dala sličan rezultat.

U testu fermentacije (Slika 32) izmjerena je EC_{50} vrijednost 80 mg/L, što je nešto viša vrijednost od one izmjerene u testu metilenskim modrilom (Slika 33), gdje je EC_{50} vrijednost iznosila 50,0 mg/L, što ne smatram znatnijim odstupanjem.

Po rezultatima testa metilenskog modrila (Slika 35) sličan rezultat dao je i **Texapon LS 35** s EC_{50} vrijednošću 70,0 mg/L, dok je u fermentacijskom testu (Slika 34) ta vrijednost bila dosta viša te je iznosila 400,0 mg/L.



Slika 34. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Texapon LS 35 u testu fermentacije. $EC_{50} = 400,0$ mg/L.



Slika 35. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Texapon LS 35 u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 70,0 \text{ mg/L}$.

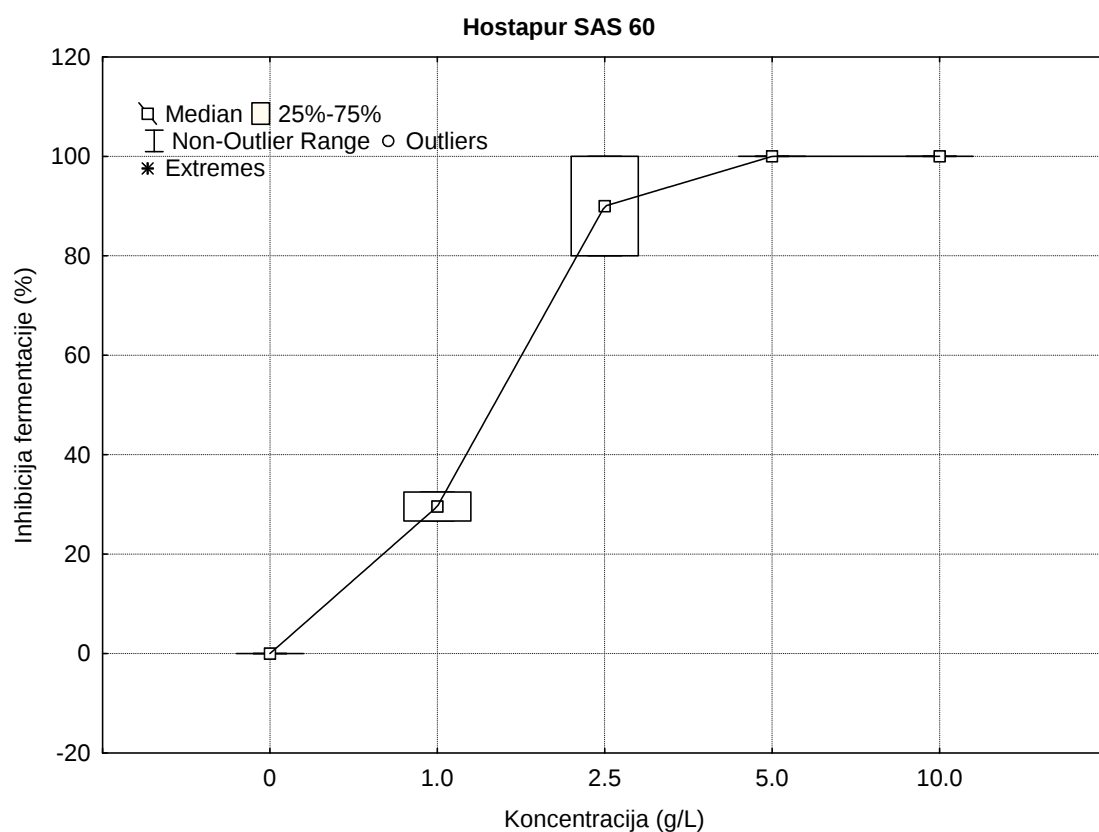
Kod surfaktanta Texapon LS 35 uočeno je znatnije odstupanje u rezultatima dobivenim u testu fermentacije i testu metilenskim modrilom.

Tako je u testu fermentacije (Slika 34) zabilježena visoka EC_{50} vrijednost od 400,0 mg/L, dok je u testu metilenskog modrila (Slika 35) ta vrijednost bila dosta niža, te je iznosila 70,0 mg/L. Takav rezultat objašnjavam mogućnošću da pri koncentraciji od 70 mg/L vjerojatno ugiba 50% kvasaca, međutim oni koji su preživjeli počnu povećano fermentirati, te tek pri vrlo visokim koncentracijama surfaktanta (400,0 mg/L) gube sposobnost fermentacije.

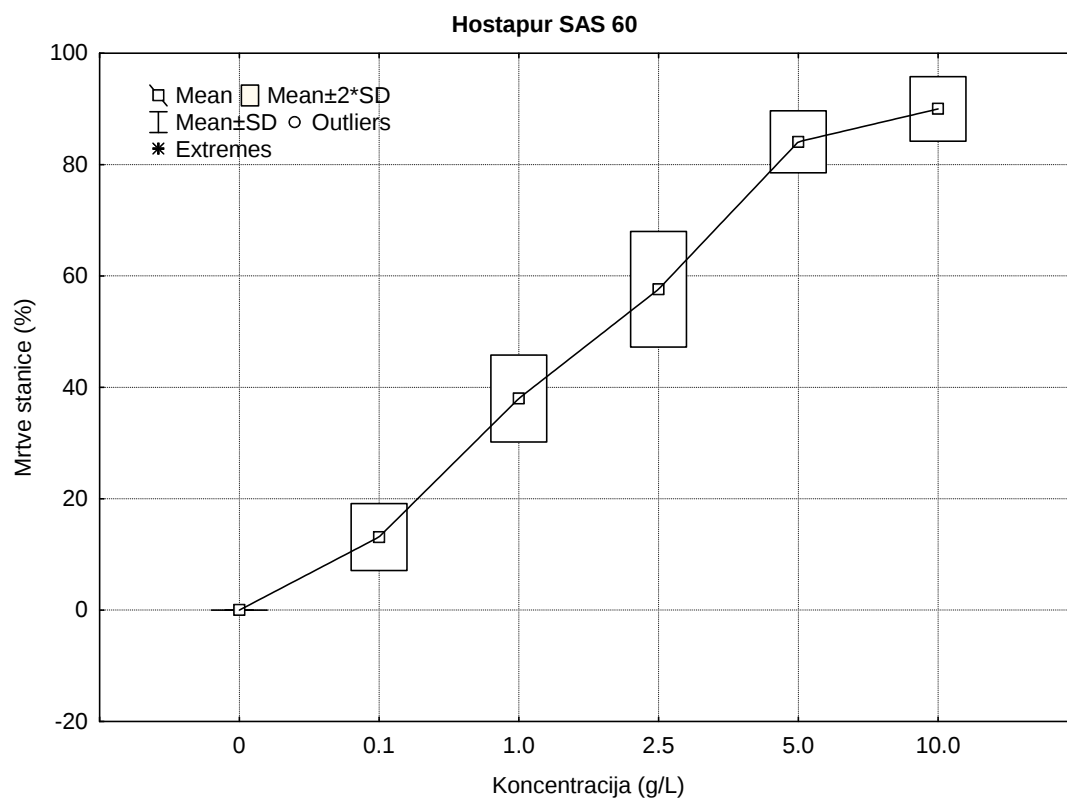
Ostali ispitivani uzorci imali su vrijednosti EC_{50} uglavnom znatno više od 100 mg/L.

To su bili: Hospatur SAS 60, Lutensit TC – EHS,

Hospatur je u fermentacijskom testu (Slika 36) postigao vrijednost EC_{50} od 1520,0 mg/L, dok je u testu metilnskog modrila (Slika 37) ta vrijednost bila 1900,0 mg/L.



Slika 36. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Hospatur SAS 60 u testu fermentacije. $EC_{50} = 1520,0$ mg/L.



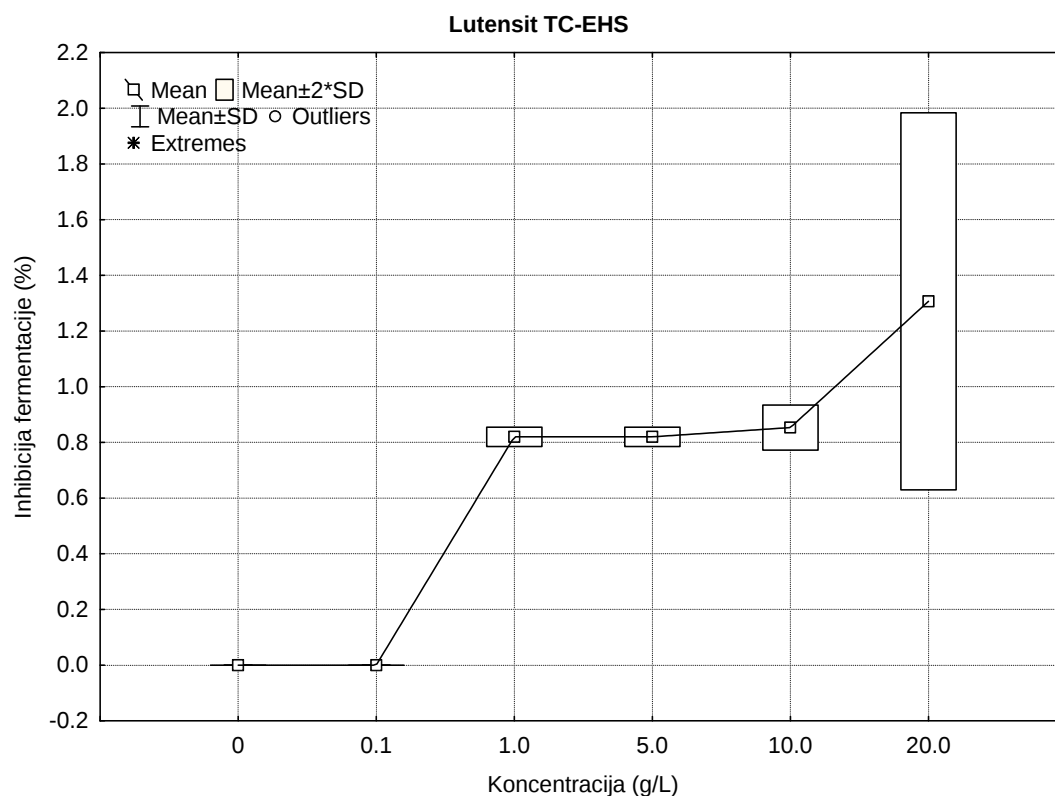
Slika 37. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Hospatur SAS 60 u testu metilenskog modrila.
 $EC_{50} = 1900,0 \text{ mg/L}$.

Iz priloženih grafičkih prikaza vidljivo je da su u oba testa izmjerene relativno visoke EC_{50} vrijednosti.

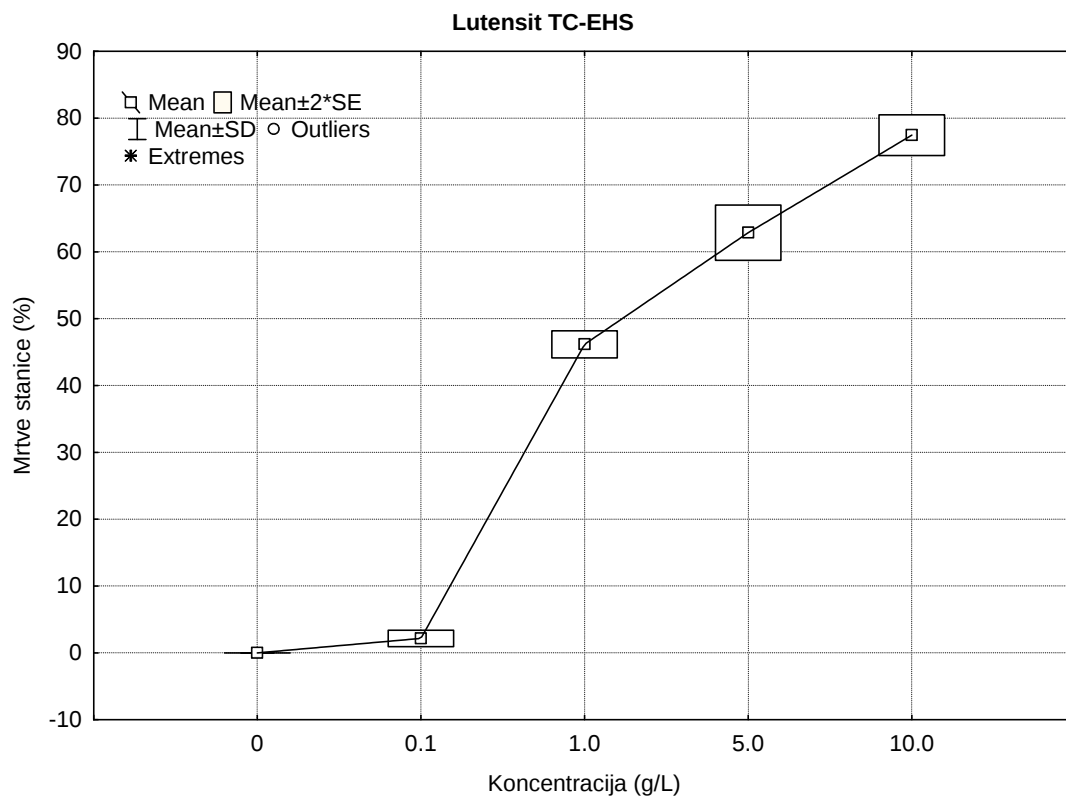
Kod sljedeća 3 surfaktanta u testu fermentacije uopće nisu izmjerene EC_{50} vrijednosti, dok su u testu metilenskog modrila one postignute pri vrlo visokim koncentracijama.

To su bili sljedeći surfaktanti:

Lutensit TC-EHS čija je EC_{50} vrijednost u testu metilenskog modrila (Slika 39) iznosila 2000,0 mg/L, dok u testu fermentacije (Slika 38) uopće nije izmjerena.



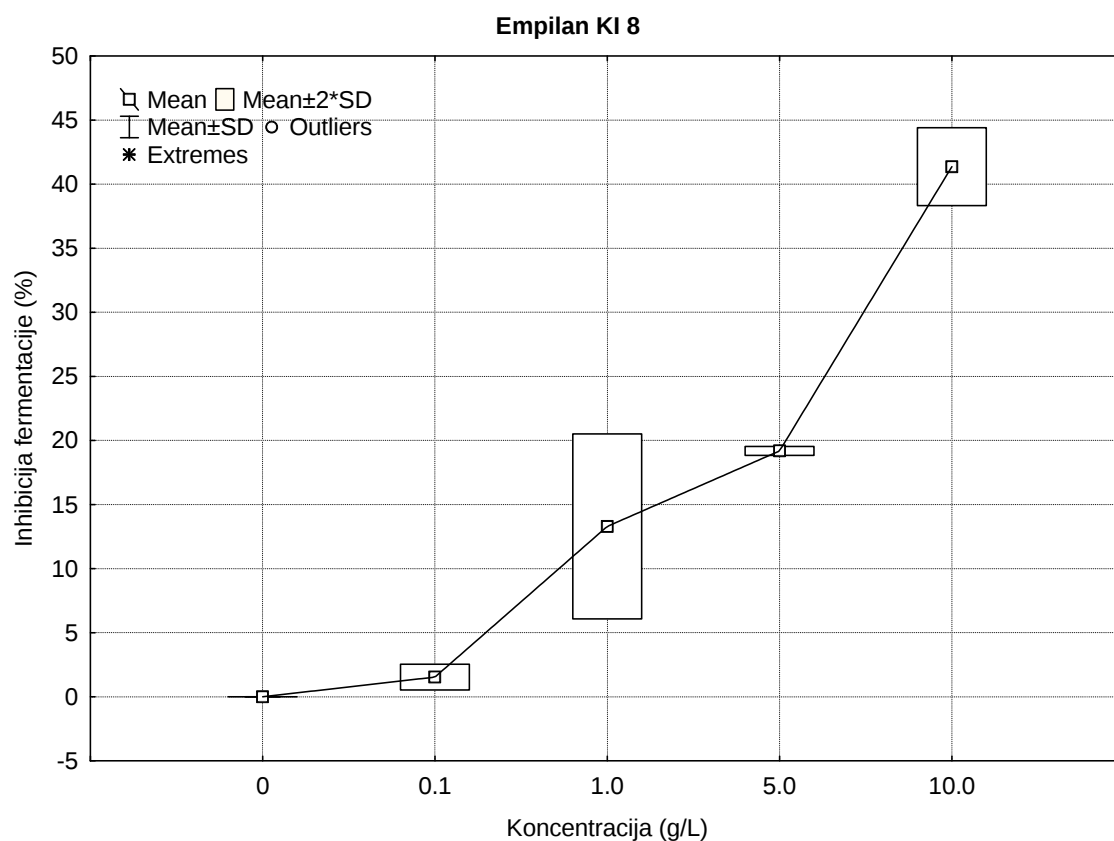
Slika 38. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Lutensit TC-EHS u testu fermentacije.



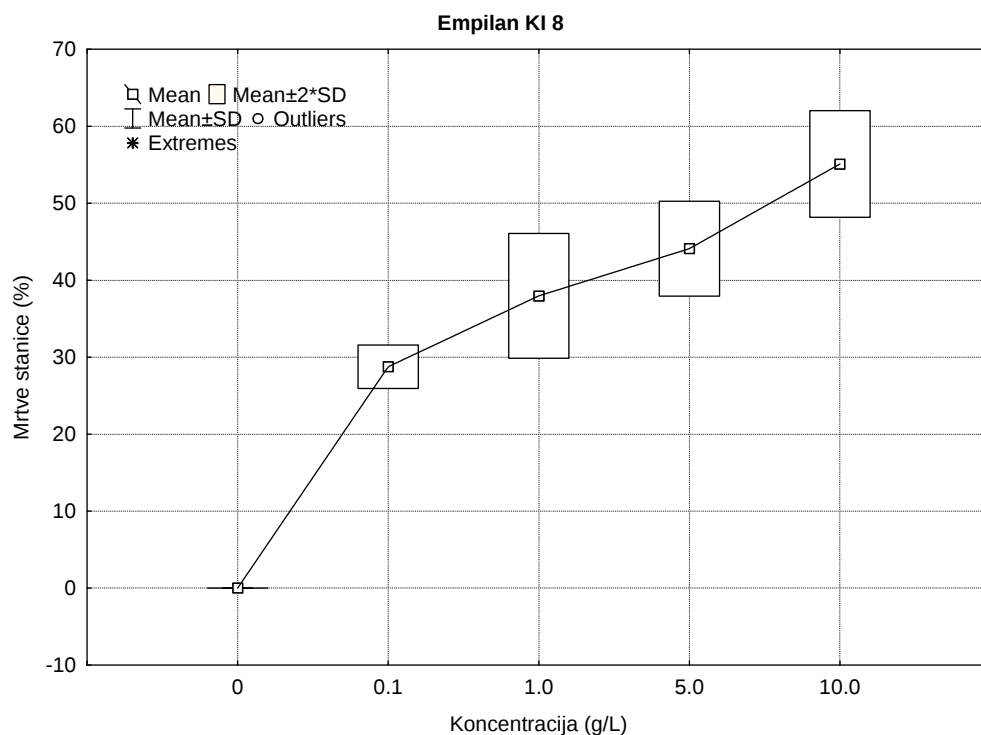
Slika 39. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Lutensit TC-EHS u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 2000,0$ mg/L.

Iz grafičkog prikaza odnosa inhibicije pri testu metilenskim modrilom (Slika 39) vidljivo je da je EC_{50} vrijednost izmjerena pri visokoj koncentraciji 2000,0 mg/L, dok pri testu fermentacije (Slika 38) vrijednost EC_{50} uopće nije izmjerena, što znači da čak ni najviša koncentracija surfaktanta Lutensit TC-EHS od 20 g/l nije uzrokovala ugibanje 50% populacije kvasaca.

Isti slučaj zabilježen je kod **Empilana KI 8** koji u fermentacijskom testu (Slika 40) također nije ni dao rezultat, a u testu metilenskog modrila (Slika 41) vrijednost EC_{50} je bila 7800,0 mg/L.



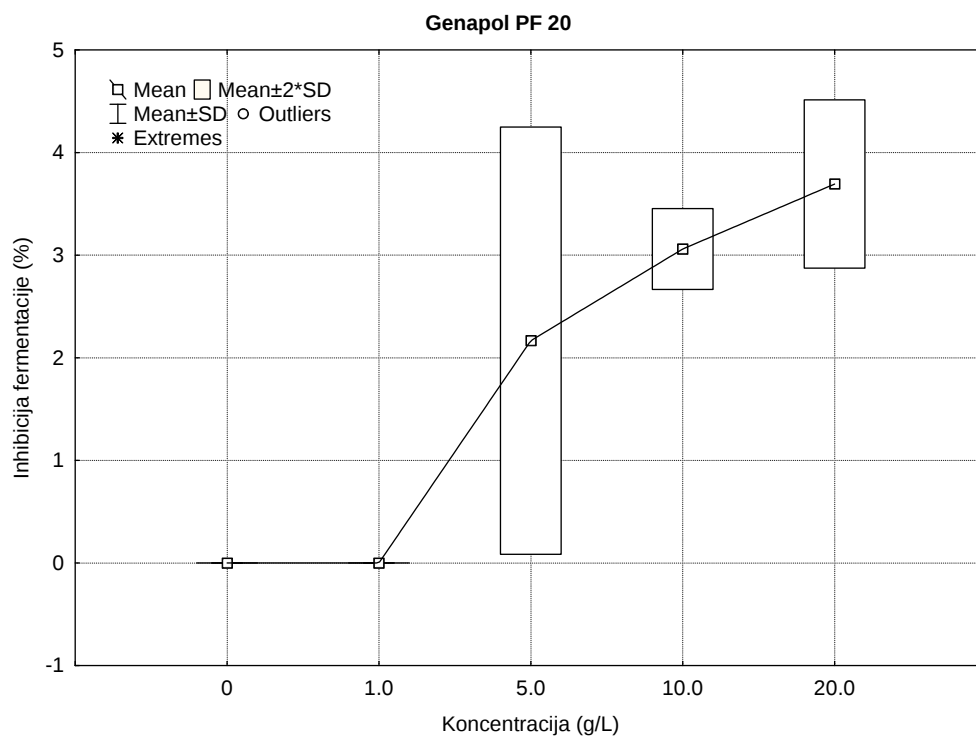
Slika 40. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Empilan KI 8 u testu fermentacije.



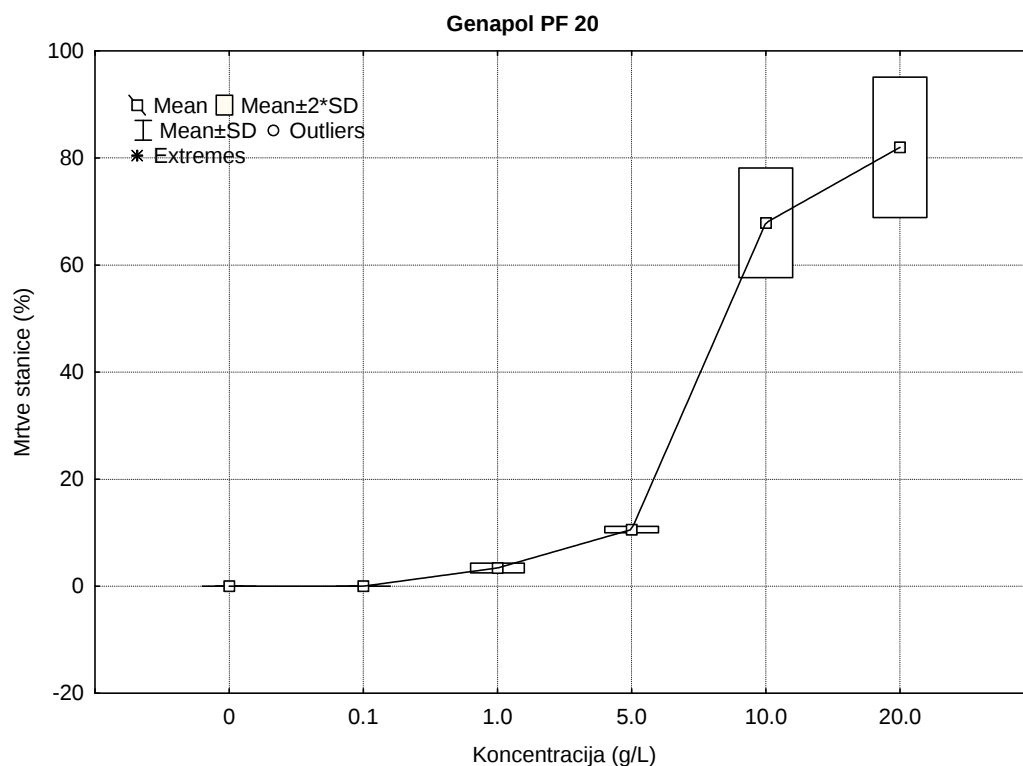
Slika 41. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Empilan KI 8 u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 7800,0$ mg/L.

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je u testu metilenskog modrila EC_{50} vrijednost za Empilan KI 8 bila vrlo visoka i iznosila 7800,0 mg/L, dok u testu fermentacije EC_{50} vrijednost nije postignuta čak ni pri najvišoj koncentraciji surfaktanta od 10 g/L.

Genapol PF 20 također je dao slične rezultate, te također nije dostignuo EC_{50} vrijednost u fermentacijskom testu (Slika 42), dok je u testu metilenskog modrila vrijednost EC_{50} bila visoka, 8500,0 mg/L (Slika 43).



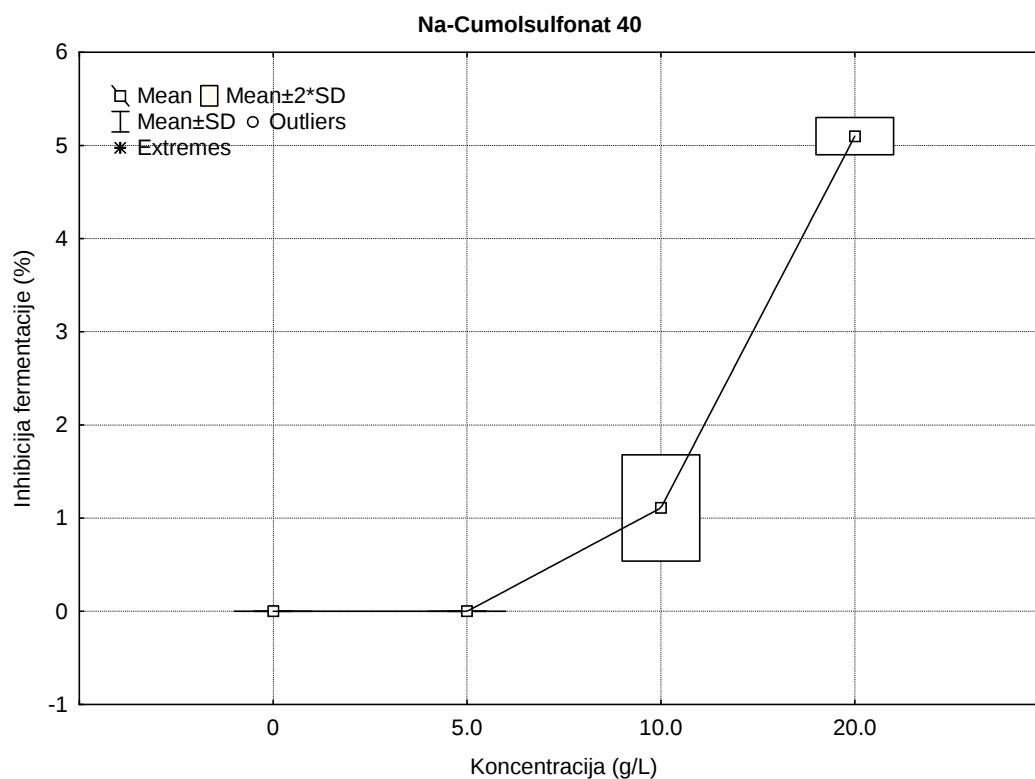
Slika 42. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Genapol PF 20 u testu fermentacije.



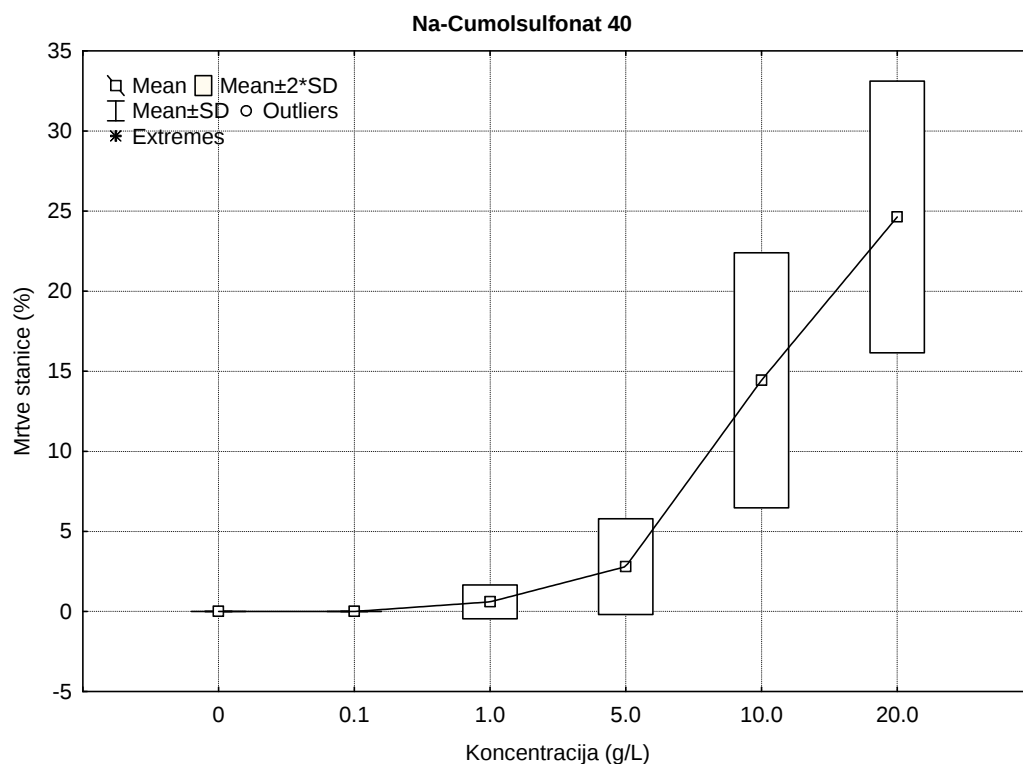
Slika 43. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Genapol PF 20 u testu metilenskog modrila. $EC_{50} = 8500,0$ mg/L.

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da u fermentacijskom testu (Slika 42) čak ni pri najvišoj koncentraciji surfaktanta od 20 g/L nije postignuta EC_{50} vrijednost, dok je u testu metilenskog modrila EC_{50} vrijednost postignuta pri koncentraciji od 8500,0 mg/L (Slika 43).

Jedan ispitivani uzorak, **Na-Cumolsulfonat 40** nije postigao EC₅₀ vrijednost ni u jednom provedenom testu. (Slika 44, 45).



Slika 44. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Na-Cumolsulfonat 40 u testu fermentacije.



Slika 45. Grafički prikaz odnosa inhibicije za Na-Cumolsulfonat 40 u testu metilenskog modrila.

Iz priloženih je grafičkih prikaza vidljivo da spoj nije postignuo EC_{50} vrijednost ni u testu fermentacije (Slika 44) pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji surfaktanta od 20 g/L, niti u testu metilenskim modrilom (Slika 45) pri istoj najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 20 g/L.

4.2. Rasprava

U ovome je radu određivana je toksičnost 15 komercijalnih surfaktanata kako bi se utvrdio njihov potencijalni utjecaj na organizme u okolišu.

Svi uzorci ispitivani su pomoću dva testa za utvrđivanje toksičnosti na kulturi kvasca *S.cerevisiae*; testom fermentacije i testom procjene toksičnosti metodom metilenskog modrila.

Test fermentacije ili *S. cerevisiae* test (Yeast Toxicity Test, YTT) je novija metoda koja je relativno nedavno valorizirana (Hrenović i sur., 2005), no za sada još nije standardizirana kao neke druge metode poput testa toksičnosti na bakterije (ÖNORM B 5105, 1995) ili testa inhibicije potrošnje kisika aktivnim muljem (ISO 8192, 1986).

Do sada se ova metoda koristila za utvrđivanje toksičnosti otpadnih voda na kulturi kvasca (Stilinović, 1981; Stilinović, 1995; Dvoraček i Stilinović, 1997; Dvoraček i Stilinović, 1998a; Dvoraček i Stilinović 1998b).

Test procjene toksičnosti metilenskim modrilom je metoda koja još nije valorizirana ni standardizirana, a koristi se kao test orijentacije da se utvrdi u kojem rasponu koncentracija je neka supstanca toksična (Stilinović, 1981), budući da se radi o jednostavnoj, brznoj i ekonomski isplativoj metodi.

U većini slučajeva rezultati fermentacijskog testa poklapali su se s rezultatima testa metilenskog modrila.

Zabilježena su tri rezultata kada to nije bio slučaj, gdje je u testu metilenskim modrilom utvrđena niža EC_{50} vrijednost, na temelju čega se može zaključiti da je test utvrđivanja toksičnosti metodom metilenskog modrila osjetljivija metoda.

U jednom slučaju u fermentacijskom testu zabilježena je veća EC_{50} vrijednost, što se može objasniti mogućnošću da preživjeli kvasci počnu povećano fermentirati, što može dovesti do pogrešnog rezultata.

Radi nedostatka sličnih radova svoje sam rezultate uspoređivala s rezultatima radova sa spojevima sličnog kemijskog sastava kao i ispitivani surfaktanti na bakterijama ili eukariotskim organizmima poput *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* ili *Gloeocapsa* sp.

Prema kriterijima Smjernice Europske Unije 93/21/EEC (1993.), objavljenoj 4. Svibnja 1993. U Official Journal of the European Communities (L110A) koja klasificira kemijske tvari s obzirom na njihov učinak na okoliš i organizme u njemu postoje 4 stupnja štetnosti: (Tablica 5).

Tablica 5. Klasifikacija kemijskih tvari s obzirom na njihov učinak na organizme i okoliš

STUPANJ ŠTETNOSTI	EC50 (mg/L)
VRLO TOKSIČAN	0,1 – 1
TOKSIČAN	1 – 10
ŠTETAN	10 – 100
NIJE ŠTETAN	> 100

Svrstavanjem ispitivanih uzoraka u spomenute kategorije, oba testa su pokazala da niti jedan uzorak ne ulazi u kategoriju vrlo toksičnih uzoraka.

Prema smjernicama EU toksičnim uzorcima su se pokazala 3 komercijalna surfaktanta: Ethomeen T/15, Arlypon VPC te Solfodac AC 3-I.

Ethomeen T/15

Izmjerena EC₅₀ vrijednost bila je 3 mg/L u fermentacijskom i u testu metilenskim modrilom. Sličani pokusi rađeni su s etoksiliranim aminima, spojevima sličnog kemijskog sastava kao Ethomeen T/15 na rakovima *Daphnia magna* gdje je zabilježena EC₅₀ vrijednost bila nešto niža, te je iznosila 0,17 mg/L (Data sheet), što spomenuti spoj svrstava u kategoriju vrlo toksičnih spojeva.

Pri testu na nitrificirajućim bakterijama (Data sheet) zabilježena je nešto veća EC₅₀ vrijednost od 64,0 mg/L, što spoj svrstava u kategoriju štetnih.

Odstupanje u rezultatima objašnjavam time što su bakterije kao prokariotski organizmi manje osjetljivi na toksikante zbog posjedovanja stanične stijenke i/ili kapsule.

Arlypon VPC

Izmjerena EC_{50} vrijednost bila je 3,3 mg/L u fermentacijskom, te 4,3 mg/L u testu metilenskog modrila.

Dobiveni rezultat u skladu je s rezultatom testova na bakterije sa spojevima sličnog kemijskog sastava (mješavini alkil etoksilata i etoksiliranih amina) gdje je izmjerena EC_{50} vrijednost iznosila >1,0 mg/L (Data sheet) što spoj također svrstava u kategoriju toksičnih.

Solfodac AC 3-I

U fermentacijskom testu izmjerena je granična EC_{50} vrijednost od 10,0 mg/L, dok je u testu metilenskim modrilom ta vrijednost bila nešto niža i iznosila je 6,0 mg/L.

U istraživanjima s linearnim alkil benzen sulfonatima, spojevima sličnog kemijskog sastava dobiveni su vrlo slični rezultati. U pokusima na *D. magna* (Verge *et al.*, 2000) EC_{50} vrijednost iznosila je 8,1 mg/L, dok je u pokusima na *Dunaiella* sp. (Utsonomiya *et al.*, 1997) ta vrijednost bila 3,5 mg/L što spoj nedvojbeno svrstava u kategoriju toksičnih, prema Smjernicama EU.

Dva ispitivana uzorka, Servamine KOO 330 i Oxidet DM 4 pokazala su se toksičnim u testu metilenskog modrila, dok su po rezultatima fermentacijskog testa svrstani u kategoriju štetnih.

Servamine KOO 330

U fermentacijskom testu izmjerena je EC_{50} vrijednost od 71,0 mg/L, dok je u testu metilenskog modrila ta vrijednost bila 7,7 mg/L.

Slični su testovi rađeni sa spojevima sličnog kemijskog sastava (kvarternim amonijevim spojevima) na bakteriji *Acinetobacter junii* (Hrenovic *et al.*, 2008) gdje je zabilježena nešto niža EC_{50} vrijednost od 0,12 mg/L. Razliku u rezultatima objašnjavam različitom osjetljivošću prokariotskih (*A. junii*) i eukariotskih (*S. cerevisiae*) organizama na toksikante, bakterije su uglavnom osjetljivije na toksikante.

Uspoređujući svoj rezultat s rezultatima rada na *Pseudomonas putida* (Suterlin *et al.*, 2007) gdje je EC_{50} vrijednost iznosila 6,0 mg/L naišla sam na veliku podudarnost s testom metilenskog modrila, gdje je EC_{50} vrijednost iznosila 7,7 mg/L, iz čega se može zaključiti da je test metilenskim modrilom nešto osjetljivija metoda, pa zato Servamine KOO 330 prema Smjernicama EU svrstavam u kategoriju toksičnih.

Oxidet DM 4

Ovaj surfaktant je također dao različite rezultate u testu fermentacije i testu metilenskim modrilom, pa je tako EC_{50} vrijednost u fermentacijskom testu bila 68,0 mg/L, dok je u testu metilenskim modrilom bila 7,0 mg/L.

Budući je Oxidet DM 4 po kemijskom sastavu miristamin oksid, svoje dobivene rezultate usporedila sam s rezultatima testova s amin oksidima na bakteriji *Photobactrium phosphoreum* (Garcia *et al.*, 2007) gdje je zabilježena EC_{50} vrijednost 2,4 mg/L, te na *D. magna* (Data sheet), gdje je ta vrijednost bila 6,8 mg/L.

Prema smjernicama EU spoj svrstavam u kategoriju toksičnih, a odstupanje u rezultatu objašnjavam većom osjetljivošću testa metilenskim modrilom.

U kategoriju ŠTETNIH uzoraka prema Smjernicama EU svrstani su N-hexadecylpyridinium chloride, N-dodecylpyridinium chloride i Kutriacid 95 A.

N-hexadecylpyridinium chloride

Izmjerena EC_{50} vrijednost bila je 52,0 mg/L u fermentacijskom testu, te 19,0 mg/L u testu metilenskog modrila. Rezultati oba testa se podudaraju te se spoj svrstava u kategoriju štetnih spojeva prema Smjernicama EU.

N-dodecylpyridinium chloride

Surfaktant također pokazuje podudarnost u oba testa, s EC_{50} vrijednošću od 26,0 mg/L u fermentacijskom, te 70,0 mg/L u testu metilenskim modrilom, što ga svrstava u kategoriju štetnih spojeva, prema Smjernicama EU.

Kutriacid 95 A

Po rezultatima testa fermentacije gdje EC_{50} vrijednost bila 80,0 mg/L, te testa metilenskim modrilom gdje je izmjerena EC_{50} vrijednost od 50, 0 mg/L, spoj se prema Smjernicama EU svrstava u kategoriju štetnih.

U testovima s linearnim alkil benzensulfonatima, spojevima sličnog kemijskog sastava kao Kutriacid 95 A na *D. magna* (Verge *et al.*, 2000), te *Dunaiella* sp (Utsunomiya *et al.*, 1997) dobivene su nešto niže EC_{50} vrijednosti, i to 8,1 mg/L za *D. magna*, te 3,5 mg/ za *Dunaiella* sp, što spoj prema smjernicama EU svrstava u kategoriju toksičnih.

Ovo odstupanje u rezultatima objašnjavam činjenicom da komercijalni surfaktanti dolaze u obliku gelova i pasti, dakle u svome sastavu sadržavaju i neke aditive, te određeni postotak vode koja može umanjiti toksičan učinak koji bi sam spoj izazvao da je prisutan u čistom obliku.

Po rezultatima testa metilenskim modrilom u kategoriju štetnih uzoraka ulazi još i Texapon LS 35.

Texapon LS 35

U testu metilenskog modrila izmjerena je EC_{50} vrijednost od 70,0 mg/L, dok je u fermentacijskom testu ta vrijednost bila znatno viša te je iznosila 400,0 mg/L što bi spomenuti surfaktant svrstalo u kategoriju ne štetnih spojeva. Vjerojatno se radi o tome da pri koncentraciji od 70,0 mg/L ugiba 50% populacije kvasaca, međutim oni koji su preživjeli počnu povećano fermentirati, a tu sposobnost gube tek pri koncentraciji surfaktanta od 400,0 mg/L.

Rezultate sam usporedila s rezultatima pokusa s alkil sulfatima, spojevima sličnog kemijskog sastava.

Rezultat testa metilenskim modrilom podudara se s rezultatom testa na *Gleocapsa* sp. (Tozum-Calgan and Atay-Guneyman, 1994) gdje je izmjerena EC_{50} vrijednost od 50,0 mg/L, dok je kod testova na *V. fischeri* (Mariani *et al*, 2006) i *A. junii* (Hrenovic et Ivankovic, 2007) ta vrijednost bila dosta niža i iznosila 2, 26 mg/L za *V. fischeri*, te 2,25 mg/L za *A. junii* što spoj svrstava u kategoriju toksičnih spojeva.

Razliku objašnjavam različitom osjetljivošću prokariotskih i eukariotskih organizama na toksikante, gdje su se bakterije (*V. fischeri* i *A. junii*) pokazale osjetljivije od eukariotskih organizama (*Gleocapsa* sp. i *S. cerevisiae*).

Ostali ispitivani uzorci imali su EC_{50} vrijednosti uglavnom znatno više od 100 mg/L, te se prema Smjernicama EU svrstavaju u kategoriju ne štetnih uzoraka.

Hospatur SAS 60

Ovaj surfaktant u fermentacijskom je testu postigao vrijednost EC_{50} od 1520, 0 mg/L, dok je u testu metilenskim modrilom ta vrijednost bila 1900,0 mg/L.

To je znatno odstupanje od rezultata testova sa spojevima sličnog kemijskog sastava (sekundarni alkan sulfonatima) na *P.putida* (Data sheet) gdje je izmjerena EC_{50} vrijednost bila >1,0 mg/L što bi spoj prema Smjernicama EU svrstalo u kategoriju toksičnih .

To objašnjavam različitom osjetljivošću prokariotskih i eukariotskih organizama na testitani spoj, gdje su se prokariotski organizmi ponovno pokazali kao osjetljiviji.

Također se ponovno radi tome da Hospatur SAS 60 dolazi u obliku paste gdje je u određenom postotku sam kemijski spoj razrijeđen vodom što smanjuje njegovo toksično djelovanje na testni kvasac.

Kod sljedeća tri surfaktanta u testu fermentacije uopće nisu izmjerene EC_{50} vrijednosti, dok su u testu metilenskog modrila one postignute pri vrlo visokim koncentracijama. To su bili Lutensit TC-EHS, Empilan KI 8 i Genapol PF 20.

Uspoređujući rezultate s rezultatima radova sa spojevima sličnog kemijskog sastava kao i testirani surfaktanti uglavnom je prisutno odudaranje u rezultatima, što se u svim slučajevima može objasniti činjenicom da komercijalni surfaktanti ne dolaze u obliku čistog kemijskog spoja, već u obliku gelova ili pasti gdje su razrijeđeni određenom količinom vode što smanjuje njihov toksičan učinak na testni kvasac.

Lutensit TC-EHS

EC₅₀ vrijednost u testu metilenskog modrila iznosila 2000,0 mg/L, dok u testu fermentacije uopće nije izmjerena, što znači da čak ni najveća koncentracija surfaktanata nije uzrokovala inhibiciju fermentacije kod 50% ispitivane populacije, po čemu se može zaključiti da surfaktant nema štetno djelovanje.

Ovaj rezultat prilično odudara od rezultata testova na bakterijama *V. fischeri* (Mariani *et al*, 2006) i *A.junii* (Hrenovic and Ivankovic, 2007) gdje su izmjerene znatno niže EC₅₀ vrijednosti od 2,6 mg/L te 2,25 mg/L.

Velika je razlika u rezultatima osim zbog činjenice da je surfaktant u obliku paste razrijeđen vodom moguća i zbog toga što se radi o različitim vrstama organizama, kvasac je eukariotski organizam, te je kao takav otporniji na djelovanje nekih kemikalija.

Empilan KI 8

Surfaktant u fermentacijskom testu također nije dao rezultat, dok je u testu metilenskog modrila izmjerena EC₅₀ vrijednost bila 7800,0 mg/L.

Dobiveni rezultat također znatno odudara od rezultata pokusa s alkohol etoksilatom na *Ceriodaphnia dubia* (Warne and Schiffko, 1999), gdje je dobivena vrlo niska EC₅₀ vrijednost od 0,39 mg/L, što ponovno objašnjavam činjenicom da je u pasti Empilan KI 8 razrijeđen vodom.

Genapol PF 20

U fermentacijskom testu također nije dostigao EC₅₀ vrijednost, dok je u testu metilenskog modrila vrijednost EC₅₀ bila visoka, te je iznosila 8500,0 mg/L.

Rezultat odudara od rezultata testova sa spojevima sličnog kemijskog sastava (polimerima etilen oksida i propilen oksida) provedenih na bakterijama (Data sheet) gdje je izmjerena EC₅₀ vrijednost veća od 1,0 mg/L.

To se također može objasniti različitom osjetljivošću prokariotskih i eukariotskih organizama na ispitivani uzorak.

Kod jednog uzorka, Na-Cumolsulfonat nije izmjerena EC_{50} vrijednost ni u testu fermentacije, ni u testu metilenskog modrila, što ukazuje na to da uzorak nije toksičan, te se prema smjernicama EU svrstava u tu kategoriju.

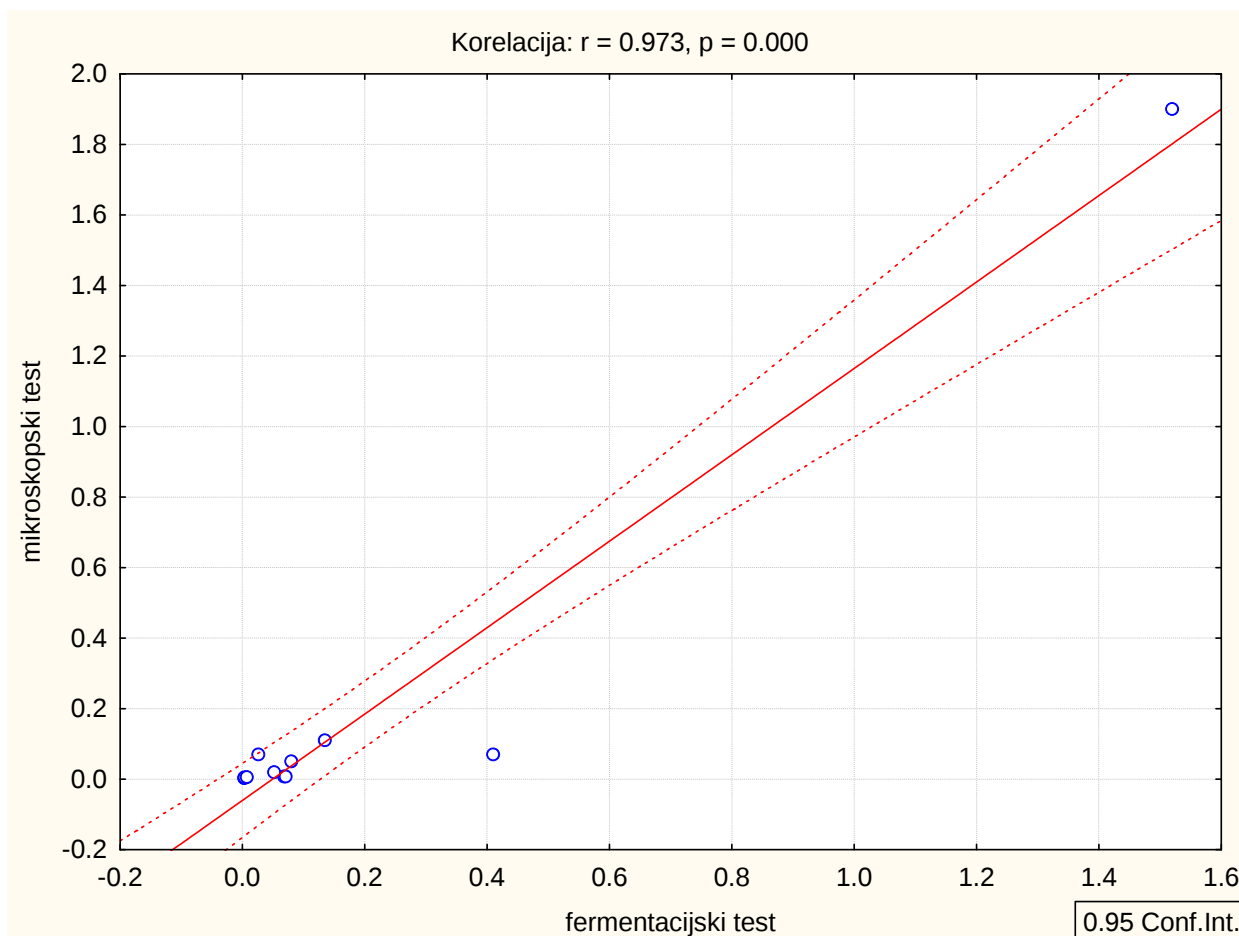
Uspoređujući svoj rezultat s rezultatima testova sa spojevima sličnog kemijskog sastava, alkil benzen sulfonatima na *D. magna* (Data sheet) vidljiva je podudarnost, jer je u tom testu izmjerena EC_{50} vrijednost bila veća od 100 mg/L, te je spoj svrstan u kategoriju ne štetnih.

Prilikom usporedbe rezultata s prethodno objavljenim radovima, *S. cerevisiae* test fermentacije i test metilenskog modrila se u većini slučajeva pokazao osjetljivijim na toksikante od testa toksičnosti na bakterije i testa inhibicije potrošnje kisika s aktivnim muljem, iz razloga što se koristi čista kultura kvasca, dok ostala dva testa koriste miješane kulture, bakterije i aktivni mulj kojeg čini heterogena populacija mikroorganizama prilagođenih na uvjete u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda (Gutierrez i sur., 2002).

S obzirom da je kvasac eukariotski organizam, bakterije se od njega, kao prokariotski organizmi, jako razlikuju. Bakterije mogu biti manje osjetljive na toksikante, budući da posjeduju staničnu stijenku i/ili kapsulu, a nemaju jezgru i većinu drugih staničnih struktura, te ih karakterizira i velika sposobnost adaptacije.

Nadalje, eukariotski organizmi se mogu ponašati drugačije od prokariotskih organizama, iako mnoga istraživanja pokazuju velike korelacije između testova koji koriste prokariotske organizme i onih koji koriste kompleksnije organizme (Kozlova i sur, 2005).

Prosječni koeficijent varijacije rezultata bio je 8,40% u fermentacijskom testu i 20,44% u testu metilenskog modrila, što su dobri rezultati za biološke metode. Vrijednosti EC_{50} u dva uspoređivana testa su bile komparabilne u većini slučajeva (Slika 46).



Slika 46 . Korelacija između vrijednosti EC_{50} fermentacijskog i mikroskopskog testa na kvascu.

U slučaju dva surfaktanta, Servamine KOO 330 i Texapon LS 35, EC_{50} vrijednosti bile su 9,2 i 5,9 puta niže u testu metilenskog modrila, što ukazuje na veću osjetljivost testa. U slučaju tri surfaktanta, Empilan KI 8, Lutensit TC - EHS i Genapol PF 20, EC_{50} vrijednosti dobivene su testom metilenskog modrila, dok u fermentacijskom testu nisu postignute.

Navedeno ukazuje da iako je prosječni koeficijent varijacije bio veći u testu metilenskog modrila, u 11 slučajeva od testiranih 15 se ovaj test pokazao osjetljiviji od fermentacijskog testa.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedena dva testa za utvrđivanje toksičnosti na kvascu *S. cerevisiae* (fermentacijski test i test metilenskog modrila) 15 komercijalnih surfaktanata došla sam do sljedećih zaključaka:

1. Na temelju rezultata provedenih testova, ispitivani surfaktanti svrstani su u 3 kategorije štetnosti, prema Smjernicama EU:
 - Od 15 ispitivanih komercijalnih surfaktanata niti jedan se nije pokazao kao VRLO TOKSIČAN
 - U kategoriju TOKSIČNIH spojeva prema rezultatima oba testa svrstana su 3 komercijalna surfaktanta: Ethomeen T/15, Arlypon VPC, te Solfodac AC-3-I
 - U kategoriju TOKSIČNIH prema rezultatima testa metilenskog modrila svrstani su i sljedeći spojevi, koji su po rezultatima fermentacijskog testa ušli u kategoriju ŠTETNIH, a to su Servamine KOO 330 i Oksidet DM 4.
 - U ŠTETNE spojeve prema rezultatima oba testa svrstana su 4 spoja, N-hexadecylpyridinium chloride, N-dodecylpyridinium chloride, Kutriacid 95 A, te Texapon LS 35 (koji se po rezultatima testa fermentacije može svrstati u kategoriju NE ŠTETNIH spojeva).
 - Ostali ispitivani spojevi pokazali su vrlo visoku EC_{50} vrijednost, ili ona čak nije postignuta, te se prema tome smatraju NE ŠTETNIM prema Smjernicama EU.

2. Od dva primjenjena testa utvrđivanja toksičnosti na kvascu *S. cerevisiae*, **test metilenskog modrila** pokazao se kao osjetljivija, jednostavnija, brža i ekonomski isplativija metoda, u čiji prilog ide i manja vjerojatnost varijacije rezultata do koje može doći u fermentacijskom testu (u slučaju kad preživjeli kvasci počnu povećano fermentirati) .

Isto tako test metilenskim modrilom metoda je koja se lako može osim u laboratoriju vrlo uspješno primjenjivati i na terenskim istraživanjima.

3. **Test fermentacije** na kvascu *S. cerevisiae* također se pokazao kao efikasna metoda, ali s nekoliko nedostataka. To se ponajprije odnosi na vrijeme potrebno za fermentaciju, pa tako prve rezultate možemo dobiti tek nakon 16 sati, koliko iznosi vrijeme potrebno za fermentaciju, što je kod utvrđivanja toksičnosti nekih supstanci predugo vrijeme kontakta budući da je zadržavanje antiseptika ili deterdženata npr. na rukama u prosjeku 1 min.
4. Nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između fermentacijskog testa i testa metilenskim modrilom.

6. LITERATURA

1. Cserhádi T., Forgács E., Oros G. (2002): Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ. Int.* **28**, 337-348.
2. Dvoraček L., Stilinović B., (1997): Usporedno određivanje toksičnosti industrijskih otpadnih voda metodom inhibicije bakterijskog rasta i YTT testom. *Hrvatska vodoprivreda*. **6**, 62-66.
3. Dvoraček L., Stilinović B., (1998a): Određivanje toksičnosti industrijskih efluenata mikrobiološkim testovima. *Hrvatska vodoprivreda*. **7**, 21-28.
4. Dvoraček L., Stilinović B., (1998b): Uporaba mikrobioloških testova u određivanju industrijskih otpadnih voda. *Hrvatska vodoprivreda* **7**, 60-67.
5. EEC 93/21 (1993): Legislation. *Off. J. Eur. Comm.* L 110A/45.
6. García M.T., Campos E., Ribosa I. (2007): Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere* **69**, 1574-1578.
7. Hegedüs I. (2005): Utvrđivanje toksičnosti sredstava za pranje mikrobiološkim testovima.
8. Hennes-Morgan E.C., de Oude N.T. (1994): Detergents. *Handbook of Ecotoxicology*. **2**, 120-154.
9. Hrenovic, J., Ivankovic T. (2007): Toxicity of anionic and cationic surfactant to *Acinetobacter junii* in pure culture. *Cent. Eur. J. Biol.* **2**, 405-414.
10. Hrenovic J., Ivankovic T., Sekovanic L., Rozic, M. (2008): Toxicity of dodecylpyridinium and cetylpyridinium chlorides against phosphate-accumulating bacterium. *Cent. Eur. J. Biol.* **3**, 143-148.
11. Hrenovic J., Stilinovic B., Dvoracek L. (2005): Use of Procaryotic and Eucaryotic Biotests. *Acta Chim. Slov.* **52**, 119- 125.
12. ISO 8192 (1986): Watter quality – Test for inhibition of oxigen consumption by activated sludge. International Standards Organization, Geneva.

13. Kozlova O., Zwinderman M., Christofi N. (2005): A new short-term toxicity assay using *Aspergillus awamori* with recombinated aequorin gene. *BMC Microbiology*. 5:40.
14. Landis W. G., (1999): Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. Lewis Publishers, Boca Raton.
15. Mariani L., De Pascale D., Faraponova O., Tornambe A., Sarni A., Giuliani S., Ruggiero G., Onorati F., Magaletti E. (2006): The use of a test battery in marine ecotoxicology: The acute toxicity of sodium dodecil sulfate. *Inc. Environ. Toxicol.* **21**, 373-379.
16. ÖNORM B 5105 (1995): Abwerverhalten von Waschmitteln für gewerbliche und industrielle Anwendung in Kfz-Werkstätten, Garagen, Tankstellen und einschligigen Nebenbetreiben. Österreichisches normungsinstitut. Wien.
17. StatSoft, Inc. (2001): Statistica (data analysis software system), version 6.
18. Stilinovic B. (1981): *Saccharomyces cerevisiae* test (YTT) as the water toxicity determination method. *Acta Bot. Croat.* **40**, 127- 131.
19. Stilinovic B. (1980): Testing of methods applying the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as test organism. *Ekotoxikologiska metoder för akvatisk miljö.* **22**.
20. Süterlin H., Alexy R., Kümmerer K. (2007): The toxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride alone and in mixtures with other anionic compounds to bacteria in test systems with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71**, 498-505.
21. Tozum-Calgan S. R. D., Atay-Guneyman N.Z. (1994): The effects of an anionic and a non-ionic surfactant on growth and nitrogen fixing ability of a cyanobacterium *Gloeocapsa*. *J. Environ. Sci. Health Part A.* **29**, 355-370.
- 22.

23. Utsunomiya A., Watanuki T., Matsushita K., Nishina M., Tomita I. (1997): Assessment of the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate and quaternary alkylammonium chloride by measuring ^{13}C -glycerol in *Dunaliella* sp. *Chemosphere*. **35**, 2479-2490.
24. Verge C., Moreno A., Bravo J., Berna J. L. (2000): Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere*. **44**, 1749-1757.
25. Walker C.H. *et al* (2001): Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London.
26. Warne M. St. J., Schiffko A.D. (1999): Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**, 196-206.
27. <http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/298880.html>
28. <http://en.wikipedia.org/wiki/Surfactants>
29. <http://www.chemistry.co.nz/surfactants.htm>
30. http://www.scienceinthebox.com/en_UK/glossary/surfactants_en.html