

Djelovanje hlapivih aromatskih ugljikovodika na vrstu *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller (Rotifera) u laboratorijskim uvjetima

Dinka, Brkić

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:128934>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dinka Brkić

Djelovanje hlapivih aromatskih ugljikovodika na vrstu
***Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller (Rotifera)**
u laboratorijskim uvjetima

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Lajtner, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Zahvaljujem dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner na pomoći kod izrade ovog rada obzirom mi je ista pomogla svojim znanjem, strpljenjem te posebice dragocjenim vremenom koje je izdvojila za mene.

Isto tako želim ovdje zahvaliti i prof. dr. sc. Radovanu Erbenu koji mi je pomogao kod prve izrade rada dajući mi prije svega smjernice i konstruktivnu kritiku mentora.

Na kraju zahvaljujem svim profesorima ovog Fakulteta obzirom su svi svojim požrtvovnim radom i zalaganje te velikim znanjem i humanošću pridonijeli, među ostalim i mome obrazovanju i stjecanju zvanja profesora biologije i kemije.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

**DJELOVANJE HLAPIVIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA NA VRSTU
DICRANOPHORUS FORCIPATUS O. F. MÜLLER
(ROTIFERA) U LABORATORIJSKIM UVJETIMA**

Dinka Brkić

Rooseveltove trg 6, 10 000 Zagreb

Svrha ovog rada bila je utvrđivanje toksičnosti aromatskih spojeva koji su glavni produkti prerade nafte i petrokemijske industrije. U tu svrhu u kontroliranim laboratorijskim uvjetima obavljeno je istraživanje djelovanja fenola i devet hlapljivih aromatskih ugljikovodika na kolnjaka *Dicranophorus forcipatus*. Uzgojena je čista kultura kolnjaka te je praćena promjena njihove brojnosti tijekom šest dana pod utjecajem odabranih aromatskih ugljikovodika. Dobiveni su rezultati pokazali uglavnom visoku smrtnost kod akutnog trovanja, posebno u prvim danima, pri čemu kod nekih od spojeva dolazi do oporavka kulture. Vrsta *D. forcipatus* pokazala se dovoljno osjetljivom za procjenu onečišćenja prirodnih, posebno kopnenih voda aromatskim spojevima.

(37 stranica, 13 slika, 4 tablice, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Rotifera, kolnjaci, *Dicranophorus forcipatus*, petrokemijski spojevi

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 18. 09. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

EFFECT OF VOLATILE AROMATIC HYDROCARBONS ON *DICRANOPHORUS FORCIPATUS* O. F. MÜLLER (ROTIFERA) IN LABORATORY CONDITIONS

Dinka Brkić

Rooseveltovo trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to determine the toxicity of aromatic compounds, which are the main products of the petroleum refining and petrochemical industries. For this purpose the effect of phenol and nine volatile aromatic hydrocarbons on the rotifer *Dicranophorus forcipatus* was investigated in controlled laboratory conditions. Pure culture of rotifers was cultivated and the change in their abundance was monitored over six days under the influence of selected aromatic hydrocarbons. The results mainly showed high mortality in acute poisoning, especially in the early days, but in some of the experiments recovering of the culture was determined. The species *D. forcipatus* has proved sufficiently sensitive to evaluate the pollution of natural, especially inland waters by aromatic compounds.

(37 pages, 13 figures, 4 tables, 67 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Rotifera, rotifers, *Dicranophorus forcipatus*, petrochemical compounds

Supervisor: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: September 18, 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Problem otpadnih voda u limnologiji	1
1.2. Opće značajke kolnjaka (Rotifera)	2
1.3. Ekologija kolnjaka (Rotifera)	5
1.4. Petrokemijski spojevi i onečišćenje voda	8
1.5. Značajke vrste <i>Dicranophorus forcipatus</i> O. F. Müller	12
1.6. Cilj istraživanja	13
2. MATERIJALI I METODE	14
2.1. Uzgoj pokusnih životinja	14
2.2. Priprema i provedba pokusa u laboratorijskim uvjetima	15
3. REZULTATI	16
3.1. Djelovanje fenola na vrstu <i>Dicranophorus forcipatus</i> O. F. Müller u zatvorenom sustavu uzgoja.....	16
3.2. Djelovanje ostalih petrokemijskih spojeva na vrstu <i>Dicranophorus forcipatus</i> O. F. Müller u zatvorenom sustavu uzgoja.....	18
4. RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31
7. ŽIVOTOPIS	37

1. UVOD

1.1. Problem otpadnih voda u limnologiji

Sve veći zamah industrijalizacije i urbanizacije društva obilježen je sve većom potrošnjom vode. Upotrijebljenoj vodi smanjuje se kvaliteta jer bude opterećena otpadnim organskim i anorganskim tvarima, odnosno onečišćenjima. Kopnene vode čiji je udio na Zemlji najmanji, a koje su naročito izložene onečišćenjima, ne služe samo čovjeku, već su i životna sredina brojnim biljnim i životinjskim vrstama. Onečišćene vode ugrožavaju biološku ravnotežu vodenih ekosustava, a ovisno o količini i vrsti onečišćenja mogu u pitanje dovesti i njihov opstanak (Tušar, 2004).

Onečišćene vode moguće je razlikovati prema količini te fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima tvari koje je onečišćuju. Prema izvorima onečišćenja, onečišćene vode moguće je podijeliti u: otpadne vode kućanstava (nastale upotrebom sanitarnih trošila vode u kućanstvu, hotelima, uredima i drugim prostorima koji imaju sanitarne čvorove), industrijske otpadne vode (nastale su upotrebom vode u proizvodnom procesu) te rashladne vode onečišćene temperaturom. Sve tri grupe otpadnih voda ujedno su sastavni dio komunalnih otpadnih voda, kojima se još mogu priključiti i otpadne vode pranja javnih prometnih površina te ponekad i procjedne vode s odlagališta neopasnog otpada, koje je potrebno pročititi prije ispuštanja u prirodne recipijente (Tušar, 2004).

Otpadne vode iz kućanstava su raznolikog sastava i u pravilu sadrže manje opasne tvari najčešće organskog porijekla, koje se brže razlažu u vodi, a za što je potrebna velika količina kisika. To su uglavnom visoko molekularni organski spojevi (proteini, masti, ugljikohidrati), zatim fekalije, deterdženti i sl. Ti se spojevi, osobito ako su u manjim količinama postupno mineraliziraju, što je preduvjet za daljnju biološku razgradnju. Za razliku od otpadnih voda iz kućanstava, industrijske otpadne vode, koje su sporedni proizvod osnovnog industrijskog procesa, sadrže brojne kemijske spojeve koji mogu izazvati ogromne poremećaje u biološkoj ravnoteži vodenih ekosustava, budući da postaju sastavni dio hidrološkog ciklusa. Mnoge od tih tvari imaju snažno toksično djelovanje, a uz to se vrlo slabo razlažu u vodi. To su primjerice, različite kiseline, teški metali, suspendirane čestice, fenoli i drugi petrokemijski spojevi, amonijak, cijanidi itd. Dok neka živa bića nakupljaju neke od tih tvari tijekom života, neke od tih tvari su otrovne za bakterije, što onemogućuje biološku razgradnju otpadnih voda. Na otrovno djelovanje tvari u sastavu industrijskih otpadnih voda, osim njihovog kemijskog

sastava i koncentracije, utječu i neki čimbenici okoliša, temperatura, udio kisika, pH vrijednost te otopljene soli u vodi (salinitet). Prolaskom kroz tlo nepročišćenih otpadnih voda u podzemlje, onečišćuju se podzemne vode, koje su osnovna zaliha pitke vode naselja i gradova. Ispuštanje otpadnih voda u svakoj je državi uređeno nizom sanitarnih i sigurnosnih propisa i zakonskih normi te je kao takvo podložno nadzoru ovlaštenih državnih organa (<https://www.zakon.hr/z/124/Zakon-o-vodama>).

Fizikalno-kemijsko djelovanje otpadnih voda u prvom se redu očituje na sastav živog svijeta u kopnenim vodama. Promjene uvjeta u okolišu dovode do promjena kvantitativnog i kvalitativnog sastava životnih zajednica. Onečišćenjem voda osiromašuje se flora i fauna, pri čemu se održe samo one vrste koje se mogu prilagoditi novonastalim uvjetima na staništu. Prilagodbe novonastalim uvjetima na staništu očituju se u sposobnosti samih vodenih organizama da djeluju na koncentraciju otpadnih tvari u vodi. Svaka vrsta specifično djeluje na promijenjene uvjete i zbog toga je prilikom proučavanja onečišćenjem narušena okoliša, potrebno obratiti pažnju na što veći broj vrsta ili barem životinjskih skupina, kao i na njihove kompetitivne i/ili suradničke odnose. Istraživanjem autekoloških obilježja većeg broja biljnih i životinjskih vrsta, moguće je steći dublji uvid u stanje ispitivane vode te uspješnije provesti biološku procjenu njezine kvalitete (Saksena, 1987; Špoljar i sur., 2011).

1.2. Opće značajke kolnjaka (Rotifera)

Kolnjaci (Rotifera) su kozmopolitski rasprostranjeni organizmi, čija je brojnost osobito velika u zajednici jezerskog zooplanktona. Većina vrsta je mikroskopskih veličina od 0,1 do 1 mm. Postoji čitav niz različitih oblika kolnjaka. Tijelo im je bilateralno simetrično, vrećastog ili valjkastog oblika. Najčešće su prozirni ili zbog sadržaja crijeva, mogu biti zelene, narančaste, crvene ili smeđe boje. Na tijelu kolnjaka moguće je razlikovati glavu, trup i nogu (Habdija i sur., 2011).

Organ koji je karakterističan za kolnjake i koji im je smješten na glavi je rotatorni organ ili trepčanik. Taj vijenac trepetljika okružuje usni otvor. Kod različitih vrsta je različitog oblika. Uloga mu je da neprestanim treperenjem trepetljika stvara struju vode koja omogućuje pokretanje životinje i prikupljanje hrane. Na netrepetljivom dijelu glave su smještene ocele, ticala i otvori retrocerebralnih žlijezda. Tijelo kolnjaka u pravilu gradi oko 1000 stanica, a svaka jedinka koja pripada određenoj vrsti ima određen i stalan broj stanica, što znači da su im organski sustavi eutelični (Habdija i sur., 2011).

Površinu tijela im štiti tanka i prozirna kutikula koju luči sincitijalna epiderma sa stalnim brojem jezgri. Kutikula je u različitim vrsta različito strukturirana. Prstenasto razdijeljena kutikula u mnogih vrsta daje prividnu kolutićavost tijela, koja ustvari omogućuje savitljivost tijela, dok stezanje uzdužnih mišića omogućuje skraćivanje tijela pri čemu se prsteni teleskopski uvlače jedan u drugi. U nekih vrsta je kutikula mjestimice zadebljala i čvrsta stvarajući tzv. loriku. U epidermi se nalaze brojne žljezdane stanice. U nekih vrsta veliki broj žljezdanih stanica nalazi se u glavi u blizini mozga stvarajući tzv. retrocerebralni organ, za kojeg se smatra da izlučuje sluz koja podmazuje rotatorni organ. Na nozi se nalazi jedan par jednostaničnih nožnih ili pedalnih žlijezda koje se otvaraju na vrhovima „prstiju“. Žljezdani sekret kolnjacima služi kao pomoć pri puzanju/koračanju te za trajno ili privremeno učvršćivanje za podlogu (sesilni oblici), a kod planktonskih oblika, žlijezde stvaraju sluz koja im pomaže pri plivanju/lebdenju u vodi. Ispod epiderme nalaze se mišićne stanice koje čine snopove mišića koji su u tijelu kolnjaka orijentirani uzdužno, prstenasto te dijagonalno (Habdija i sur., 2011).

Živčani sustav kolnjaka je ganglijski, a čini ga glavni ganglij („mozak“) smješten u glavi iz kojeg izlaze mnogobrojni živci prema osjetilnim organima smještenima na prednjem dijelu tijela i prema unutarnjim organima, dok je s trbušne strane smještena živčana vrpca s ganglijima (Habdija i sur., 2011).

Osjetilni sustav čine osjetne četine i završeci živaca koji su raspoređeni po čitavom tijelu, a najviše na površinskim ticalima (neparno leđno ticalo i parna lateralna ticala). Od velikog broja osjetnih stanica i organa, svjetlosnim mikroskopom moguće je uočiti ocele koje su smještene bočno i na vrhu glave i direktno na „mozgu“ (Habdija i sur., 2011).

Tjelesna šupljina je blastocelom u kojoj se nalazi crijevo i unutarnji organi, a ispunjena je tekućinom i mrežom ameboidnih stanica.

Probavni sustav započinje ustima smještenima na prednjem dijelu tijela, koja su okružena vijencem trepetljika. Na usta se nastavlja ždrijelo u kojem se nalazi poseban organ sastavljen od više kutikulariziranih dijelova – *trofi*, pa se tako složeno građeno ždrijelo naziva žvačnjak ili *mastax*. Rad žvačnjaka moguće je promatrati mikroskopom kroz prozirnu kutikulu. Sastoji se od neparnog dijela (*fulcrum*) na kojeg se nastavljaju parni ogranci (*ramus*), kuke (*uncinus*) i dršci (*manubrium*). Potporanj i parni ogranci budu združeni u *inkus*, a kuka i držak u *maleus*. Oblik *trofa* je prilagodba načinu prehrane kolnjaka. Stoga prema vrsti hrane i načinu njezina skupljanja kolnjaci su podijeljeni u tri glavne hranidbene skupine: sakupljače – filtratore, žderače i predatore. Najveći broj vrsta pripada sakupljačima – filtratorima koji se hrane bakterijama, algama i vrlo sitnim česticama detritusa. Njihov je žvačnjak građen poput sita pa

trepčanikom usmjeravaju struju vode prema ustima i ždrijelu. Žderači su kolnjaci koji se hrane većim algama i organskim česticama, pri čemu uz pomoć posebno građenog žvačnjaka prihvate algu ili veću organsku česticu te je uvuku u ždrijelo i progutaju. Kolnjaci predatori su grabežljivci koji se hrane pretežno praživotinjama i drugim sitnijim vrstama kolnjaka. Plijen hvataju pomoću žvačnjaka nalik na kliješta. U žvačnjak se otvaraju slinske žlijezde. Iza žvačnjaka slijedi jednjak koji vodi u želudac. Na prijelazu jednjaka u želudac nalazi se par želučanih žlijezda. Želudac je vrećastog ili cjevastog oblika, a okružen je mišićima. Iz želuca izlazi crijevo koje se otvara u nečisnicu. U nečisnicu se otvaraju i parni protonefridiji i sjemenovodi ili jajovodi. Uloga slinskih i želučanih žlijezda je izlučivanje probavnih enzima, zbog čega se smatra da kolnjaci imaju izvanstaničnu (ekstracelularnu) probavu (Habdija i sur., 2011).

Kao i većina drugih mikroskopski sitnih beskralježnjaka, nemaju razvijene posebne organe za disanje. Stoga se izmjena plinova otopljenih u vodi (kisika i ugljikova dioksida) odvija difuzijom. Također, nemaju ni posebno razvijen optjecajni sustav, već se tvari po tijelu raznose difuzijom, pomoću različitih vrsta ameboidnih stanica i dodatno gibanjem i miješanjem otopljenih tvari i vode u blastocelomskoj tekućini koje omogućuju mišići prilikom savijanja tijela i kretanja životinje.

Organi za ekskreciju kod svih kolnjaka su parni protonefridiji koji reguliraju udio vode u tijelu i izlučivanje produkata metabolizma. Protonefridiji se otvaraju u mokraćni mjehur koji završava u nečisnici. Kod nekih vrsta u nečisnicu ulaze protonefridijalne cijevi (Habdija i sur., 2011). Kolnjaci su razdvojenog spola, a građa spolnog sustava je varijabilna. Kod većine vrsta spolni sustav ženke sastoji se od jednog ili dva jajnika koji se nalaze u blastocelomu i sincitijalne su građe. Spolni produkti jajovodom putuju do spolne pore u nečisnici. U svom završnom dijelu jajovodi prelaze u plodnicu. Mužjaci imaju vrećasti sjemenik. Na njega se nastavlja sjemenovod. Uz sjemenovod se nalaze dvije prostatičke žlijezde. Mužjaci nemaju crijevo, pa se sjemenovod otvara tzv. genitalnom porom koja odgovara crijevnom otvoru kod ženki. Stražnji dio sjemenovoda preobražen je u kopulatorni organ. Svaki od tri podrazreda kolnjaka (Seisonida, Bdelloidea (Digononta), Monogononta) imaju drukčiji način razmnožavanja. Predstavnici Seisonida razmnožavaju se biseksualno, dok kod predstavnika Bdelloidea nisu poznati mužjaci te se ženke razmnožavaju partenogenezom. U predstavnika Monogononta postoje amiktičke (partenogenetske) i miktičke (spolne) ženke, pa u životnom ciklusu kolnjaka ovog razreda dolazi do izmjene spolnog i partenogenetskog razmnožavanja (heterogonije) (Habdija i sur., 2011).

Kolnjaci su kozmopolitski rasprostranjeni organizmi, pri čemu preko 90 % poznatih vrsta nastanjuje kopnene vode. Dio njih su planktonski oblici, a dio sesilni ili polusesilni oblici. Neke su vrste zadružne, pri čemu zadruge u pravilu tvore partenogenetski razmnožene jedinke.

1.3. Ekologija kolnjaka (Rotifera)

Kolnjaci su široko rasprostranjeni višestanični organizmi koji naseljavaju velika jezera, male privremene lokve, te intersticijalne i kapilarne vode. Moguće ih je pronaći i u kiselim i blago lužnatim jezerima te otvorenom oceanu, kao i u hiperoligotrofnim alpskim jezerima te nekim kanalizacijskim vodama. Najčešće se pojavljuju u gustoći do 1000 jedinki po litri i važni su kao potrošači bakterija i algi (Segers, 2008). Na pojavu kolnjaka na nekom području utječe složena interakcija različitih fizikalnih, kemijskih, geografskih, bioloških i ekoloških parametara (Hulyal i Kaliwal, 2008). Mogućnost prilagodbe fizikalno-kemijskim i biološkim promjenama na staništu može se povezati s njihovim manjim veličinama, propusnim tijelima i visokim stopama fluktuacije (Nogrady i sur., 1993; Sladeček, 1983). Fauna slatkovodnih kolnjaka igra važnu ulogu u ekološkoj ravnoteži i ima potencijalnu vrijednost kao biopokazatelj promjene trofičkog stanja (Stemberger, 1979; Sladeček, 1983). Stoga je razumijevanje funkcije navedenih čimbenika na raznolikost faune najvažniji izazov za ekologe i biogeografe (Gatson, 2000).

Ekološki čimbenici staništa koji posebno utječu na životni ciklus kolnjaka su temperatura i salinitet vode, potom pH vrijednost vode, svjetlost i količina hrane (Pourriot, 1965; Esparcia i sur., 1989). Većina kolnjaka su euritermni organizmi te podnose velika temperaturna kolebanja, a posebice su se tome prilagodili načinom razmnožavanja, odnosno trajanjem pojedine faze životnog ciklusa. Vrste *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766 i *Colurella uncinata* (O. F. Müller, 1773) pronađene su u termalnim vrelima na temperaturi od 81 °C, a vrsta *Lepadella ovalis* (Müller, 1786) na temperaturi 30 do 42 °C. Vrste *Keratella cochlearis* (Gosse, 1851), *Lepadella patella* (O. F. Müller, 1773) te *Polyarthra dolichoptera* (Idelson, 1925), mogu živjeti i na temperaturi od 1 do 4 °C. Mnoge vrste iz rodova *Keratella* i *Polyarthra* moguće je pronaći u kopnenim vodama neovisno o godišnjem dobu, što znači da se mogu prilagoditi i visokim i niskim temperaturama. Za razliku od njih, stereotermne vrste moguće je pronaći samo u određenom razdoblju tijekom godine.

Iako gotovo 90 % poznatih vrsta kolnjaka živi u kopnenim vodama, većina poznatih i istraživanih vrsta podnosi dosta visoki salinitet. Primjerice vrste *Cephalodella gibba* (Ehrenberg, 1830) i *Testudinella patina* (Herman, 1783) podnose slanost do 8 ‰. Neke vrste iz roda *Testudinella* koje žive u litoralnom području mora, osjetljive su i na manje promjene u koncentraciji soli. Istraživanja ipak potvrđuju da su kolnjaci pretežno eurihalini, što potvrđuje velik broj vrsta koje žive u bočatim vodama (Miracle i Serra, 1989; Filho i sur., 2014).

Uočeno je da su kolnjaci osjetljivi na pomanjkanje kisika u vodi, osim nekih polisaprobnih vrsta npr. *Epiphanes macroura* (Barrois & Daday, 1894), *Brachionus calyciflorus*, *Dicranophorus forcipatus* (O. F. Müller, 1786) i dr. Mnoge vrste kolnjaka ugibaju bez dovoljno kisika kroz jedan ili nekoliko sati. Vrsta *Lecane luna* (Müller, 1776) pri sobnim uvjetima živi bez kisika 3 do 6 sati. *Lepadella ovalis* i *Brachionus angularis* (Gosse, 1851), 1 do 5 sati, *Keratella cochlearis* i *Keratella quadrata* Cartin, 1943, 1 do 4 sata, *Asplanchna priodonta* Gosse, 1850, 3 do 5 sati, *Filinia longiseta* (Ehrenberg, 1834), 1 do 2 sata, *Synchaeta pectinata* Ehrenberg 1832, 2 do 3 sata, a *Trichocerca cylindrica* (Imhof, 1891) do 1 sat. Naravno, potrošnja kisika ovisi i o temperaturi vode i kod nekih kolnjaka pri temperaturi od 22 °C iznosi oko 33 % mase njihova tijela. Potreba za kisikom raste kod starijih jedinki i s povećanjem količine hrane na staništu (Kutikova, 1970).

Poznato je da su pojava i brojnost kolnjaka u jezerima ograničeni pH vrijednošću vode (Wallace i sur., 2006; Segers, 2007). S obzirom na pH vrijednost vode kolnjake su još 1928. godine, Haring i Myers, podijelili u tri skupine. Prva su skupina kolnjaci koji podnose pH vode veći od 7, tj. alkalične vode. Takvi su rodovi *Brachionus*, *Asplanchna*, *Mytilina* i *Filinia*. Drugu skupinu kolnjaka čine vrste koje mogu živjeti i u alkaličnim i kiselim vodama i oni su najbrojniji. Trećoj skupini pripadaju rodovi *Cephalodella*, *Lepadella*, *Trichocerca*, *Lecane* i dr., koji žive u vodama niske pH vrijednosti, odnosno kiselim vodama (Moser i Weisse, 2011a, b; Weisse i sur., 2011), iako mnoge od tih vrsta u nepovoljnim uvjetima preživljavaju i veće promjene pH vrijednosti prema bazičnosti (Yin i Niu, 2008), a što je uočio Donner još 1951. godine.

Osjetljivost na svjetlost pokazuju pelagički oblici, dok kod bentoskih ona nije izražena. Poznato je da neki planktonski oblici kolnjaka pokazuju dnevno-noćna gibanja u odnosu na količinu svjetlosti. Pokusima je potvrđeno da vrsta *Brachionus calyciflorus* posebno reagira na crveni i zeleni dio spektra, dok vrsta *B. angularis* reagira na plavi dio spektra. Kolnjaci svjetlost u pravilu primaju ocelama i/ili cijelom površinom tijela.

Dostupnost hrane je uz temperaturu glavni ograničavajući ekološki čimbenik za opstanak kolnjaka na nekom staništu. Neki se hrane detritusom, neki bakterijama i algama, a neke su

vrste predatori koji se hrane praživotinjama i sitnijim kolnjacima. Neke su vrste polifagne te iako su specijalizirane za pojedinu hranu, u slučaju njezina nedostatka na staništu, prijeći će na drugu dostupnu hranu. Takve su primjerice vrste iz roda *Asplanchna*, koje se hrane praživotinjama i drugim sitnijim kolnjacima, a u nedostatku životinjske hrane, započet će se hraniti i algama. Kao i kod drugih vrsta organizama, intenzitet hranjenja ovisi o temperaturi i dostupnosti hrane u okolišu. Utvrđeno je da je kod većine vrsta intenzitet jedenja najveći pri 20 do 25 °C, a najmanji pri 5 °C (Erman, 1956). I brzina filtracije okolne vode kod filtratornih vrsta proporcionalna je s količinom dostupne hrane, odnosno što ima više hrane u vodi to je kolnjaci brže filtriraju (Pourriot i Rougier, 1975; Gilbert i Starkweather, 1978; Gilbert, 1980; Salt, 1987).

Kolnjaci imaju važnu ulogu u hranidbenim odnosima u vodenim staništima te su glavna planktonska hrana za različite životinjske skupine (oblice, maločetinaše, virnjake, vodengrinje, ličinke kukaca koji dio života provode u vodi i brojnim drugim životinjama). Smanjenje kvalitete vode u slatkovodnim sustavima utječe na brojnost kolnjaka u njima jer su osjetljivi na eutrofikaciju i salinizaciju vode. Također, istraživanjem je utvrđeno da osjetljivost na specifične spojeve iz skupine insekticida široko varira (Segers, 2008).

Poznato je da kolnjaci imaju veliki značaj u prehrani riba te da ponekad čine preko 90 % planktonske hrane u ribnjacima. Mlade ribe prije nego u potpunosti prijeđu na prehranu planktonom, hrane se prvenstveno kolnjacima. Čak su i ličinke pojedinih vrsta riba prehranom vezane za određenu vrstu kolnjaka (Skaramuca, 1994). Kolnjaci sudjeluju i u procesu samoočišćenja voda jer se hrane bakterijama i detritusom. Pritom treba spomenuti i mogućnost očišćenja vode od nekih radioaktivnih elemenata pri čemu je moguće pratiti prijenos tvari u trofičkim interakcijama i biogeokemijskim procesima te doznati mogu li ti sustavi metabolizirati određene spojeve (Gorokhova, 2017).

Zbog velikog kolonizacijskog kapaciteta mnogih vrsta, kolnjake čovjek svojim djelatnostima lako prenosi na nova staništa. Poznato je nekoliko primjera unošenja kolnjaka u područja koja oni prije nisu nastanjivali (Dartnall, 2005; Wallace i sur., 2006). No, zbog mikroskopskih veličina kolnjaka i oskudice sveobuhvatnih studija, kolnjaci se još uvijek nedovoljno koriste u procjeni i očuvanju bioraznolikosti nekog područja, iako je utvrđena njihova ekonomska važnost za akvakulturu. Također poznati su slučajevi korištenja kolnjaka za ispitivanje nekih narkotika (Nogrady i Rowe, 1993).

1.4. Petrokemijski spojevi i onečišćenje voda

Preradom nafte i zemnog plina, u petrokemijskoj se industriji osim benzina kao glavnog proizvoda, dobivaju i sporedni produkti: etilen, propilen, butilen i tehnički benzin. Njihovom daljnjom preradom dobivaju se: polietilen, etanol, etanolamini, glikoli, stiren, α -metilstiren, itd. Katalitičkim reformiranjem dobivaju se benzen, toluen, kumen, etil-benzen i brojni drugi spojevi koji se koriste u proizvodnji plastičnih masa, deterdženata, lijekova i u druge svrhe. Tijekom proizvodnje i transporta, petrokemijski produkti dopijevaju s industrijskom otpadnom vodom u površinske vode, a potom i u podzemne, budući da lako prodiru kroz tlo (Munjko, 1971; Mahammedilyas Basha i sur., 2010). Većina petrokemijskih proizvoda, osobito spojevi s aromatskom jezgrom, vrlo su toksični za čovjeka i druga živa bića. Kod visokih koncentracija, biogena razgradnja biva zakočena, pa se dugo zadržavaju u vodama i tlima (Ernest i sur., 1991; Mc Lelland, 1991).

Fenol, (C_6H_5OH), je pri sobnim uvjetima tvar u obliku bezbojnih prizmatskih kristala oštra mirisa. Talište mu je pri $43\text{ }^\circ\text{C}$, a vrelište (1 atm) $132\text{ }^\circ\text{C}$. Na fizikalna svojstva fenola najveći utjecaj ima hidroksilna skupina zahvaljujući kojoj fenoli mogu stvarati vodikove veze s drugim molekulama fenola i s vodom. Iz tog razloga spojevi iz skupine fenola imaju viša tališta i vrelišta i topljivi su u vodi od aromatskih ugljikovodika slične molekulske mase. Topljivost fenola u vodi je oko 9 g/100 g vode pri $25\text{ }^\circ\text{C}$, a potpuno na $65\text{ }^\circ\text{C}$. Ako su u čistom fenolu prisutne male količine vode, vrelište se snižava ispod sobne temperature. U tekućem stanju, kada sadrži oko 5 % vode, fenol se naziva karbolna kiselina. Na zraku fenol poprima ružičastu boju zbog malih količina oksidnih produkata. Fenol se dobiva iz katrana kamenog ugljena te benzena. Hidroksilna skupina ($-OH$) fenola daje kiselu reakciju (konstanta disocijacije, $K_a=1,0 \times 10^{-10}$). Kiselost je jača nego u alkohola i vode, a slabija nego u karbonskih kiselina i ugljične kiseline. Fenol je vrlo toksičan jer uzrokuje koagulaciju proteina te razgrađuje kožu kralježnjaka, pa tako i čovjeka. Apsorbira se u krv i djeluje kao nervni otrov. Iz organizma se uglavnom izlučuje urinom. Smrtonosan je u dozama već od 1 g, a dulja izloženost rezultira štetnim djelovanjem na meka tkiva, pluća, bubrege, krvožilni sustav i srce (Bruce i sur., 1987). Osim što štetno djeluju na ljudsko zdravlje, fenol i njegovi spojevi akumuliranjem u okolišu izazivaju niz poremećaja za sve sastavnice okoliša. Onečišćuju zrak, vodu i tlo na način da dovode do promjena kemijskih i bioloških svojstava staništa, ciklusa hrane, te mikrobiološke i enzimske aktivnosti u vodi i tlu (Mahammedilyas Basha i sur., 2010).

U prirodi, u površinske vode fenol dopijeva prirodnim putem, razgradnjom ostataka biljaka ili fenolnim otpadnim vodama petrokemijske i drugih srodnih industrija budući da se fenol upotrebljava kao polazna sirovina u sintezi različitih proizvoda tzv. procesne industrije (Ibrahim i sur., 2011; de Morais i sur. 2012; Mohammadi i sur., 2015). Uklanjanje fenola vezano je uz djelovanje mikroorganizama, ponajprije aerobnih bakterija koje su sposobne prilagoditi se na određene količine fenola i njegovih spojeva male molekularne mase, te ga razgrađuju kao organsku tvar (Di Gioia, D. i sur., 2002). Još šezdesetih godina prošlog stoljeća ispitivana je toksičnost fenola najviše u odnosu na ribe, pri čemu je utvrđeno da se toksičnost fenola smanjuje s porastom tvrdoće vode (Hammerstingl, 1952). Akutna toksičnost fenola za vodene organizme vidljiva je iz dobivenih LC_{50} vrijednosti koja primjerice za test organizam *Daphnia magna* Straus, 1820 iznosi od 0,09 do 85 mg/dm³, a za vrstu *Pimephales promelas* Rafinesque, 1820 od 1,17 do 110 mg/dm³ (Iurascu i sur., 2009.). Iz tog su razloga brojne države i međunarodne organizacije ograničile dopuštenu koncentraciju fenolnih spojeva u pojedinim vrstama voda (Padilla-Sanchez i sur., 2011; Elci i sur., 2011.). Tako, primjerice, zakonodavstvom Europske unije (EU Directive 2455/2001/EC) maksimalno dopuštena koncentracija ukupnih i pojedinačnih fenola u vodi za piće je 0,5 µg/dm³, odnosno 0,1 µg/dm³ (Peng i sur., 2007; Elci i sur., 2011). Dopuštene koncentracije fenola i fenolnih spojeva u pojedinim vrstama kopnenih voda i moru propisane Uredbom Vlade Republike Hrvatske kreću se od 1,5 do 25 µg/dm³ (Narodne novine 137/08). Iz industrijskih otpadnih voda koje sadrže fenol i njegove spojeve, oni se najčešće uklanjaju biološkom obradom u procesima s aktivnim muljem, ekstrakcijom, adsorpcijom i kemijskom oksidacijom.

Aceton je po sastavu keton, (CH_3COCH_3). Pri sobnim je uvjetima bezbojna, lako zapaljiva i lako hlapljiva tekućina karakterističnog mirisa. Aceton se koristi za otapanje drugih kemijskih tvari i brzo se miješa s vodom, alkoholom, dimetilformamidom, kloroformom, eterom i većinom ulja. Dobiva se i kao koprodukt sinteze fenola i kumena, pri čemu nastaju male količine metanola, acetofenola i metil-stirena. Prirodnim putem aceton nastaje kao jedan od proizvoda butil-alkoholnog vrenja ugljikohidrata. Produkti ove fermentacije su n-butil alkohol, aceton i etanol, kisik i ugljikov dioksid. U čovjekovu organizmu aceton (do nekoliko mg dnevno) nastaje razgradnjom masti. Pri dugotrajnom gladovanju i dijabetesu u krvi se također nagomilavaju velike količine acetoacetata, β-hidroksibutirata i acetona, molekula koje se zajedničkim imenom nazivaju ketonskim tijelima.

Aceton se smatra postojanim u zraku jer mu je vrijeme poluraspada 22 do 23 dana (Gierczak i sur., 1998), dok se ne smatra postojanim u vodi jer iz nje ishlapi za manje od tjedan dana i osim toga, nema značajne adsorpcije acetona u sedimente i suspendirane krute tvari (Rathbun

i sur., 1982; Rathbun i sur., 1991). Provedena istraživanja uglavnom su pokazala akutnu toksičnost acetona za vodene biljke i alge te vodene mikroorganizme (Liebmann, 1960; Hutchinson i sur., 2006; Han i sur., 2008; Cho i sur., 2009). Aceton je za životinje koje žive u vodi relativno otrovan, pa je tako granica toksičnosti za ribe 5-11 g/L, a za ostale životinjske vrste oko 9,3 g/L (Liebmann, 1960). Što se tiče kronične toksičnosti acetona, ona je istraživana na ribama i vodozemcima gdje je uočen i teratogeni učinak (Hutchinson i sur., 2006; Pollard i Adams, 1988).

Benzen, toluen, etil-benzen (BTEX), kumen, stiren i α -metilstiren su aromatski ugljikovodici čiju osnovu grade čine šesteročlani prsteni te su derivati osnovnog spoja, odnosno benzena, C_6H_6 . Benzen je najjednostavniji aromatski ugljikovodik koji se dobiva destilacijom katrana kamenog ugljena, a može se proizvesti i sintetski. Pri sobnim uvjetima benzen je bezbojna lako hlapljiva tekućina, karakterističnog mirisa, vrelišta pri 80 °C, a pri 5,5 °C prelazi u čvrsto stanje. Benzen i njegove pare su kancerogene. Otapa masti, ulja i smole, gori svijetlim čađavim plamenom, a pomiješan sa zrakom stvara eksplozivnu smjesu. Po nekim je kemijskim svojstvima sličan zasićenim ugljikovodicima (postojan prema oksidaciji, ne polimerizira), a po drugima je sličan nezasićenim ugljikovodicima (burno reagira sa sumpornom i dušičnom kiselinom). Upotrebljava se u kemijskoj industriji kao otapalo i polazna sirovina za dobivanje brojnih aromatskih spojeva. Benzen i njegovi derivati su neurotoksični i hematotoksični, što je najviše potvrđeno u istraživanjima na ljudima i ostalim sisavcima (Wallace, 1989; Rosenberg, 1989; Greenberg, 1997). Granica toksičnosti benzena kod riba je 5 – 20 mg/L. Vrsta *Daphnia magna* bila je izložena potencijalno smrtonosnim koncentracijama acetona, benzena, benzenske kiseline, butanola, 1,2-diklor benzena, 2-metil naftalina, 1,1,2-tetrakloretana, 1,2,4-triklorbenzena i toluena. Nakon 48 sati izmjerene su koncentracije navedenih kemikalija u tijelu ove vrste te je utvrđena njihova prisutnost od 0,02 do 6310 mmol/kg tjelesne mase, ovisno o kemikaliji (Pawlisz, 1993).

Toluen je metil-benzen, $C_6H_6CH_3$. Pri sobnim uvjetima je također bezbojna lako zapaljiva tekućina, slabo topljiva u vodi. Toluen se koristi kao sirovina u kemijskoj industriji za proizvodnju fenola i toluen-diizocijanata (TDI), benzojeve kiseline, benzil-klorida, ksilena, vinil-toluena, benzaldehida i krezola, a u manjoj mjeri i kaprolaktama. Toluen je važan i u proizvodnji TNT-a, saharina i deterdženata. Simptomi trovanja kod riba, slični su kao i kod benzena. Najveće koncentracije toluena na prirodnim staništima nađene su u uzorcima uzetim iz površinskog slatkovodnog sloja koji je iznad slane vode (Harland i sur., 1982). Zbog velike hlapljivosti toluena i velike razlike u vrijednostima topljivosti u slanoj i slatkoj vodi iz

literature, rezultati statičkih ispitivanja bez analize koncentracije izloženosti su nepouzdana (Jones i Zabel, 1996).

Etil-benzen, $C_6H_5C_2H_5$, je moguće izolirati iz ksilenske frakcije nafte u kojoj ga ima oko 20 %. Kao i benzen, etil-benzen je pri sobnim uvjetima bezbojna lakozapaljiva tekućina, čije je vrelište na $136,2\text{ }^\circ\text{C}$. Zbog niske topljivosti u vodi kao i toluen i etilbenzen se u zraku zadržava dulje od benzena, a iz atmosfere se uklanjaju oksidacijom. U prisutnosti dovoljne količine kisika u vodi i tlu BTEX se vrlo brzo razgrađuju djelovanjem bakterija. U anaerobnim uvjetima, primjerice u podzemnim vodama, bakterijska je razgradnja spora i može trajati mjesecima. Iako etil-benzen ima nisku akutnu i kroničnu toksičnost, u literaturi se ipak navode dokazi o njegovu štetnom djelovanju na središnji živčani sustav (WHO, 1996).

Kumen, $C_6H_5CH(CH_3)_2$, je izopropil benzen koji se dobiva iz propilena i benzina, a služi u sintezi fenola i kao visokooktanska komponenta u avionskom gorivu. Iako je zapaljiva i lako hlapljiva tekućina pri sobnim uvjetima, gotovo netopljiva u vodi.

Stiren, $C_6H_5CH=CH_2$, je najjednostavniji među arilalkenima. Pri sobnim je uvjetima bezbojna tekućina oštra aromatična mirisa, tališta na $-31\text{ }^\circ\text{C}$, a vrelišta na $145\text{ }^\circ\text{C}$. Dobiva se preradom nafte i katrana kamenog ugljena, a može se pripremiti i dehidrogeniranjem etil-benzena. Stiren lako polimerizira u polistiren koji ima široku primjenu u svakodnevnom životu kao „inertna“ plastična masa za pakiranje i čuvanje hrane te kao izolator u građevini. U travnju 2016. stiren je dodan na listu kancerogenih spojeva s obzirom na njegova svojstva zapaljivosti, akutne toksičnosti, potencijalne mutagenosti te velike ekotoksičnosti za alge i rakove i djelomične ekotoksičnosti za ribe i kopnene kralježnjake (Earth Resource Foundation, 2016; European Commission Environment, 2016).

α -metilstiren, $C_6H_5C(CH_3)=CH_2$, je također pri sobnim uvjetima bezbojna, hlapljiva i lakozapaljiva tekućina. Dobiva se katalitičkom dehidrogenacijom kumena i metil-benzena. Nastaje i kao nusprodukt sinteze fenola iz kumena. Često služi kao zamjena za stiren, iako lako ne polimerizira, no njegova je proizvodnja jednostavnija.

Acetofenon, $C_6H_5COCH_3$, je fenil metil keton. Poznat je u obliku bezbojne uljaste tekućine ili bezbojnih, lako taljivih kristala. Netopljiv je u vodi. Važan je kao intermedijarni spoj u proizvodnji stirena. Dobiva se Friedel-Craftsovom reakcijom iz benzena i acetil klorida ili anhidrida octene kiseline, odnosno benzena i benzoil-klorida. Industrijski se proizvodi od etil-benzena katalitičkom oksidacijom sa zrakom. Kloriranjem ili bromiranjem acetofenona nastaju jaki suzavci. Acetofenon je ugodna mirisa na narančin cvijet ili jasmin te se stoga koristi u proizvodnji mirisa i kao otapalo.

Mezitol-oksidi su ketoni koji nastaju od acetona u jako kiseloj, kataliziranoj reakciji. Ovaj spoj je međuproizvod pri sintezi polimera. Otpadni materijal koji sadrži mezitol-oksidi nije dozvoljeno izbacivati u kanalizaciju ni u vodotoke, iako nema kriterija o dopustivoj koncentraciji tog otapala u vodi (Uhlík, 2007).

1.5. Značajke vrste *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller, 1786

Vrstu *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller, 1786 taksonomski (www.faunaeur.org) svrstavamo u:

CARSTVO: Animalia

KOLJENO: Rotifera

RAZRED: Eurotatoria

PODRAZRED: Monogononta

NADRED: Pseudotrocha

RED: Ploima

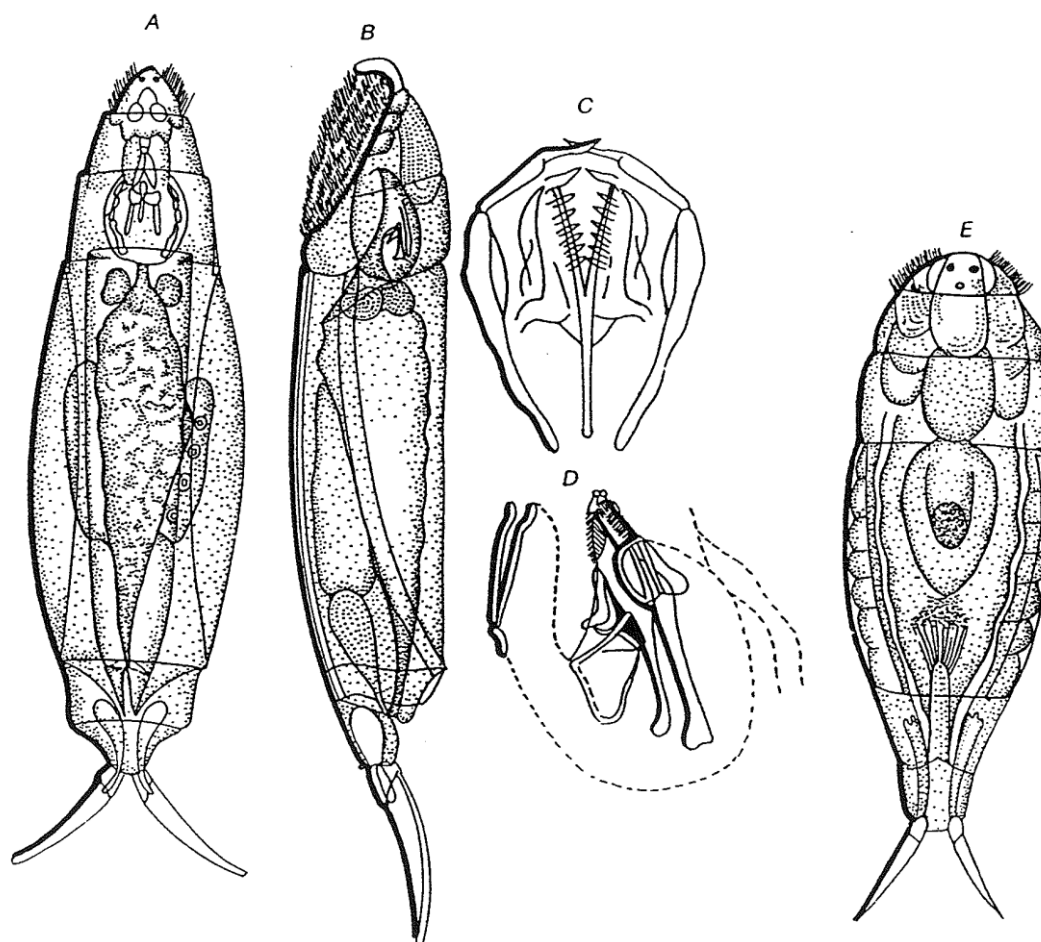
PORODICA: Dicranophoridae

ROD: *Dicranophorus*

VRSTA: *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller, 1786

Vrsta *D. forcipatus* O. F. Müller, 1786 je kozmopolitski rasprostranjen planktonski slatkovodni kolnjak (Jersabek, 1998). Tijelo mu je umjereno tanko, prozirno i malo ispupčeno na stražnjoj strani. Na prednjem dijelu tijela nalazi se mali rostrum, a na kraju tijela kratka noga. Prsti noge su slabo nagnuti prema trbušnoj strani i nešto prema van, a na vrhovima su zaoštreni. Među nožnim žlijezdama s trbušne strane tijela nalazi se mali mjehurić. Žvačnjak (*mastaks*) je forcipatnog tipa, što znači da je ova vrsta prilagođena hvatanju plijena. Parni ogranci (*ramusi*) su krupni s 5 do 10 (najčešće 7) nazubljenja na unutrašnjim krajevima. Potporanj (*fulcrum*) je dvostruko kraći od parnih ogranaka. *Epifarinks* ima oblik dvaju štapića. S lijeve strane žvačnjaka smještene su žlijezde slinovnice, a ispod njega s obje strane nalaze se dva para žlijezda s granulama. Retrocerebralna vrećica je teško zamjetna. Frontalne ocele su male. Prosječna duljina životinje je 218 – 500 µm, duljina prstiju 50 – 100 µm, a žvačnjaka 50 – 84 µm. U ove vrste poznati su mužjaci duljine do 300 µm, dakle manji su od ženki i u pravilu se pojavljuju periodički, u miktičkoj fazi životnog ciklusa. Ženke imaju jedan ovarij, a mužjaci jedan sjemenik što je ujedno i obilježje cijelog razreda Monogononta.

Vrstu *D. forcipatus* moguće je pronaći i u obraštajnim zajednicama litoralnih područja kopnenih voda (Špoljar i sur., 2011) i nekih mora te u podzemnim vodama.



Slika 1. Vanjski izgled vrste *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller, 1786
(A. ženka s leđne strane, B. ženka bočno, C. žvačnjak s leđne strane,
D. žvačnjak bočno, E. mužjak s leđne strane; preuzeto iz Matoničkin i Erben, 1994)

1.6. Cilj istraživanja

U laboratorijski kontroliranim uvjetima obavljani su pokusi s kolnjacima vrste *Dicranophorus forcipatus* na način da su populacije ove vrste izlagane djelovanju različitih toksičnih spojeva nastalih kao produkt petrokemijske industrije te se kao takvi mogu pronaći u otpadnim vodama.

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi otpornost, odnosno stupanj mortaliteta u odnosu na koncentraciju i vrijeme djelovanja dodanih spojeva (fenol, acetofenon, meztitil-oksidi, stiren, α -metilstiren, benzen, etil-benzen, kumen, toluen, aceton).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzgoj pokusnih životinja

U laboratorijskim uvjetima uzgajana je vrsta *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller, 1786. Životinje su se tijekom duljeg vremena spontano pojavljivale u kulturi s amebama. Odavde su oprezno izolirane mikropipetom kako bi se dobila što čišća kultura samih kolnjaka. Premješten su u kristalizirke promjera 8 cm ispunjene s 50 mL otopine za uzgoj sljedećeg sastava (Wichterman, 1953):

NaCl	0,1 g
KCl	0,004 g
CaCl ₂	0,006 g
H ₂ O, redest.	1 L

U ovu je otopinu dodano i jedno zrno riže. Priređivanje otopine pokušano je i s destiliranom vodom, no uzgoj je mnogo brže i stabilnije tekao u otopini pripremljenoj s redestiliranom vodom. Tome je najvjerojatniji uzrok niska pH vrijednost otopine (pH oko 5,4), pripremljene s destiliranom vodom, što ponekad usporava i priječi rast bakterija kojima se vrsta *D. forcipatus* u ovim uvjetima hrani.

Kulture su držane u termostatu, u mraku, na temperaturi od 22 do 23 °C. Razvitak ove vrste uspjeva i na nižim temperaturama, a budući da je ova vrsta kolnjaka euritermna, moguće ju je uzgajati na temperaturama od -5 do +30 °C. No, kako je uzgoj najbrže napredovao pri izabranoj temperaturi, ostalo se pri njoj. Ova se vrsta kolnjaka može uzgajati i na svjetlu, iako se nešto sporije razmnožava nego u termostatu ili polumraku. Takav način održavanja kulture kolnjaka bez protočne vode i prozračivanja pripada zatvorenom sustavu uzgoja.

Tijekom uzgoja pokusnih životinja, otopina u kojoj je držana vrsta *D. forcipatus* mijenjana je potpuno ili je samo nadolijevana do volumena koji je ispario. Budući da ove životinje u pravilu plivaju blizu dna, jednostavno se odlije tekućina iz kristalizirke i dolije svježja, kada stara postane onečišćena ili prezasićena organizmima uslijed čega je došlo do iscrpljenja hranjivih tvari iz otopine. Nove su kulture ovog kolnjaka nasađivane pipetom, prenošenjem životinja iz stare u novu, svježju otopinu. Tako osvježena kultura bila je pogodna za obavljanje pokusa kroz tjedan dana, nakon što su se životinje dovoljno razmnožile.

2.2. Priprema i provedba pokusa u laboratorijskim uvjetima

Fenol je kao i drugi petrokemijski proizvodi nabavljen u laboratoriju tvornice OKI Zagreb. Čistoća tih proizvoda je preko 99 %, uz različite ostatke. Kod fenola su to tragovi vode i limunske kiseline. Na kraju pokusa je obavljena kontrola koncentracije fenola što je također napravljeno u laboratoriju tvornice OKI Zagreb. Ostali petrokemijski proizvodi koji su korišteni u pokusima te njihova čistoća navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Petrokemijski proizvodi korišteni u pokusu, njihova čistoća i topljivost u vodi

Naziv i sažeta strukturna formula petrokemijskog proizvoda	Čistoća (%)	Ostatci	Topljivost u vodi
acetofenon, $C_6H_5COCH_3$	99,50	mezitil oksid 0,4 % α -metilstiren 0,1 %	netopljiv u vodi
mezitil-oksidi, $CH_3COCH=C(CH_3)_2$	99,90	-	oko 28 g/L (20 °C)
stiren, $C_6H_5CH=CH_2$	99,98	p-tercbutil katahol, sumpor i tragovi etilbenzena i toluena	0,32 g/L (25 °C)
α -metilstiren, $C_6H_5C(CH_3)=CH_2$	99,20	butil-benzen 0,48 % kumen 0,3 %, acetofenon 0,01 % i mezitil-oksidi 0,01 %	0,56 g/L (20 °C)
benzen, C_6H_6	99,98	laksi ugljikovodici u tragovima	1,77 g/L (20 °C)
etil-benzen, $C_6H_5C_2H_5$	99,80	tragovi benzena	0,2 g /L na 20 °C
kumen, $C_6H_5CH(CH_3)_2$	99,95	benzen 0,03 %, toluen 0,02 %	netopljiv u vodi
toluen, $C_6H_5CH_3$	98,80	benzen, etil-benzen, cikloheksan, tragovi lakih ugljikovodika	0,52 g/L na 20 °C
acetoni, CH_3COCH_3	99,50	voda	miješa se s vodom u svim omjerima

Korištene su tri koncentracije petrokemijskih spojeva po dekadskom aritmetičkom nizu izražene volumnim jedinicama od 0,01, 0,1 i 1 mL na 50 mL kulture. Ti su volumeni dodavani mikropipetom graduiranom od 1 do 10 μ L.

Za izvođenje pokusa korištene su kristalizirke od 200 mL. U njih je presađivana kultura s hranjivom otopinom. Broj kristalizirki je odgovarao broju koncentracija ispitivanih spojeva, a jedna je kristalizirka bila kontrolna. Životinje su nakon presađivanja radi oporavka držane u termostatu 24 sata. Nakon toga je određen njihov početni broj i dodani su određeni volumeni istraživanih spojeva. Time je započeo pokus (0 sati) koji je trajao 6 dana. Osim na početku pokusa, broj životinja je kontroliran nakon 24 i 48 sati, odnosno drugog i trećeg dana te šestog dana. Na taj se način nastojalo utvrditi djelovanje istraživanih spojeva kod akutnog i kroničnog trovanja (Martin i sur., 1993).

3. REZULTATI

3.1. Djelovanje fenola na vrstu *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller u zatvorenom sustavu uzgoja

Rezultati djelovanja fenola na vrstu *Dicranophorus forcipatus* u zatvorenom sustavu uzgoja prikazani su u Tablici 2. i grafički na Slici 1.

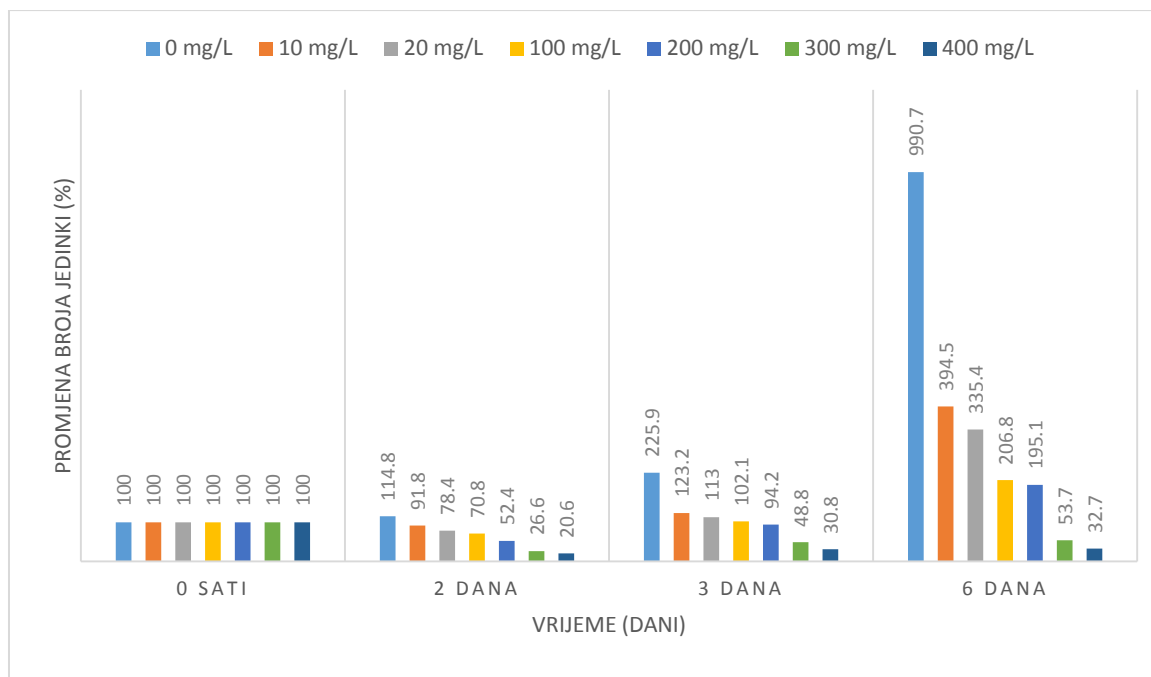
Tablica 2. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem fenola izražena u postocima (%)

Koncentracija fenola (mg/L)	0,0	10,0	20,0	100,0	200,0	300,0	400,0
Vrijeme (dani)	Promjena broja jedinki (%)						
0	100	100	100	100	100	100	100
2	114,8	91,8	78,4	70,8	52,4	26,6	20,6
3	225,9	123,2	113,0	102,1	94,2	48,8	30,8
6	990,7	394,5	335,4	206,8	195,1	53,7	32,7

Broj jedinki u kontrolnoj skupini je tijekom šest dana bio u stalnom porastu (Tablica 2, Slika 1). U prva 24 sata zabilježeno je blago povećanje broja jedinki, da bi nakon 48 sati njihov broj bio dvostruko veći (225,9 %). Šestog dana pokusa broj jedinki se povećao za 990,7 %.

Očekivano, broj jedinki je drugog dana pokusa pao u svim istraživanim koncentracijama, međutim već treći dan taj broj raste iznad 100 % u koncentracijama od 10,0; 20,0 i 100 mg/L.

Uočeni trend se nastavlja i dalje te šestog dana pokusa broj jedinki u koncentracijama od 10,0 do 200,0 mg/L dostižu brojnost veću od 100 %. Jedino u dvije najviše koncentracije ta vrijednost ostaje niska i iznosi 53,7 % za koncentraciju od 300 mg/L i 32,7 % za koncentraciju od 400 mg/L no i za njih je uočen blagi porast vrijednosti u odnosu na treći dan pokusa (Tablica 2, Slika 1).



Slika 1. Grafički prikaz promjene broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem fenola izražen u postocima (%)

Rezultati mjerenja koncentracije fenola u vodi, provedeni nakon šestog dana pokusa u laboratoriju tvornice OKI Zagreb, pokazali su pad svih početnih koncentracija fenola, pri čemu je najveći pad vrijednosti zabilježen kod dvije najniže koncentracije fenola i iznosio je 40 %, odnosno 60 % početne vrijednosti koncentracije.

Tablica 3. Promjena koncentracije fenola tijekom pokusa

Vrijeme (dani)	Koncentracija (mg/L)					
	10,0	20,0	100,0	200,0	300,0	400,0
0	10,0	20,0	100,0	200,0	300,0	400,0
6	4,0	12,0	16,0	32,0	112,0	104,0
u %	40	60	16	16	34	26

3.2. Djelovanje ostalih petrokemijskih spojeva na vrstu *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller u zatvorenom sustavu uzgoja

Rezultati djelovanja ostalih petrokemijskih spojeva (Tablica 1) na vrstu *Dicranophorus forcipatus* u zatvorenom sustavu uzgoja prikazani su u Tablici 4 i na Slikama od 2 do 13.

Za sve ostale petrokemijske spojeve korištene u pokusima, postavljena je i praćena jedna kontrolna postava. U toj je postavi broj jedinki postupno rastao i na kraju šestog dana dostignuta vrijednost iznosila je 677,9 % od početnog broja jedinki.

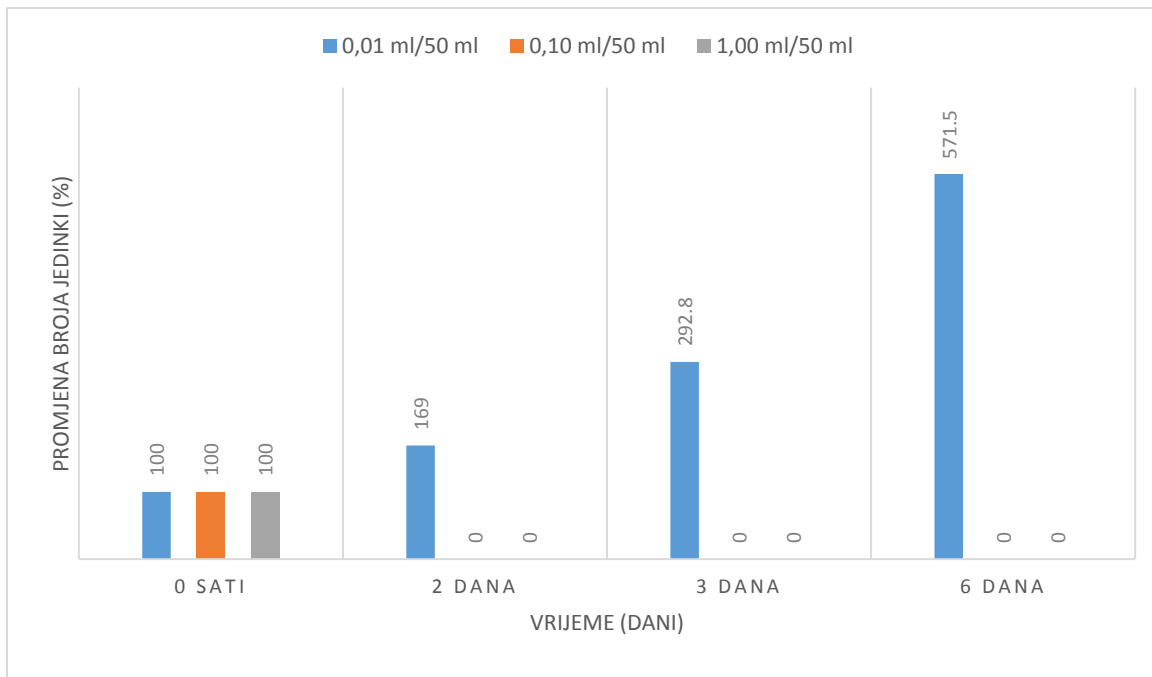
Tablica 4. Promjena broja jedinki pod utjecajem odabranih petrokemijskih spojeva izražena u postocima

Ispitivani petrokemijski spojevi	Volumni omjer u mL/50 mL	Vrijeme (dani)			
		0	2	3	6
		Promjena broja jedinki (%)			
acetofenon	0,01	100	169,0	292,8	571,5
	0,10	100	0	0	0
	1,00	100	0	0	0
mezitol-oksidi	0,01	100	104,9	173,1	275,6
	0,10	100	0	0	0
	1,00	100	0	0	0
stiren	0,01	100	110,4	146,5	313,9
	0,10	100	12,0	69,7	227,1
	1,00	100	0	0	0
α -metilstiren	0,01	100	115,5	137,2	337,7
	0,10	100	98,9	88,9	224,4
	1,00	100	0	0	0
benzen	0,01	100	156,6	220,0	1750,0
	0,10	100	80,5	100,0	481,9
	1,00	100	0	0	0
etil-benzen	0,01	100	112,5	148,8	367,7
	0,10	100	96,0	92,1	245,0
	1,00	100	17,5	47,3	143,3

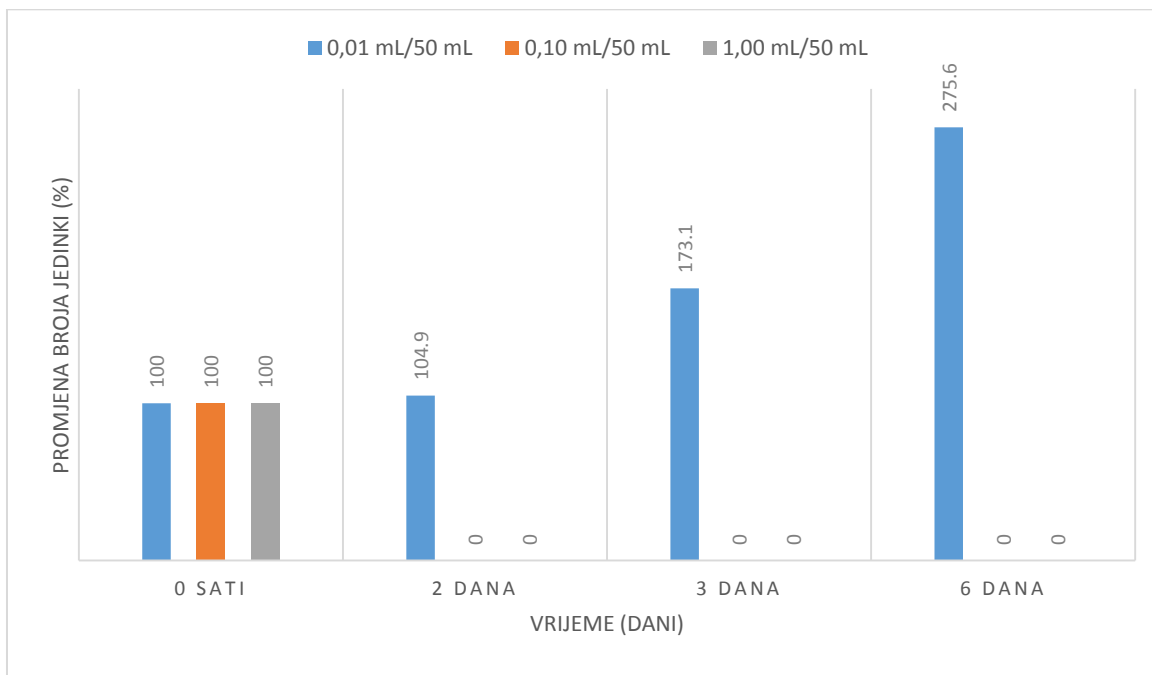
Nastavak Tablice 4.

kumen	0,01	100	95,9	108,2	175,3
	0,10	100	53,3	70,0	136,6
	1,00	100	10,7	44,6	241,0
toluen	0,01	100	109,7	146,2	402,1
	0,10	100	85,5	103,9	280,2
	1,00	100	20,6	26,8	64,0
aceton	0,01	100	181,0	246,5	886,2
	0,10	100	113,9	179,1	545,8
	1,00	100	124,1	150,8	269,8
KONTROLA	0,00	100	194,9	283,0	677,9

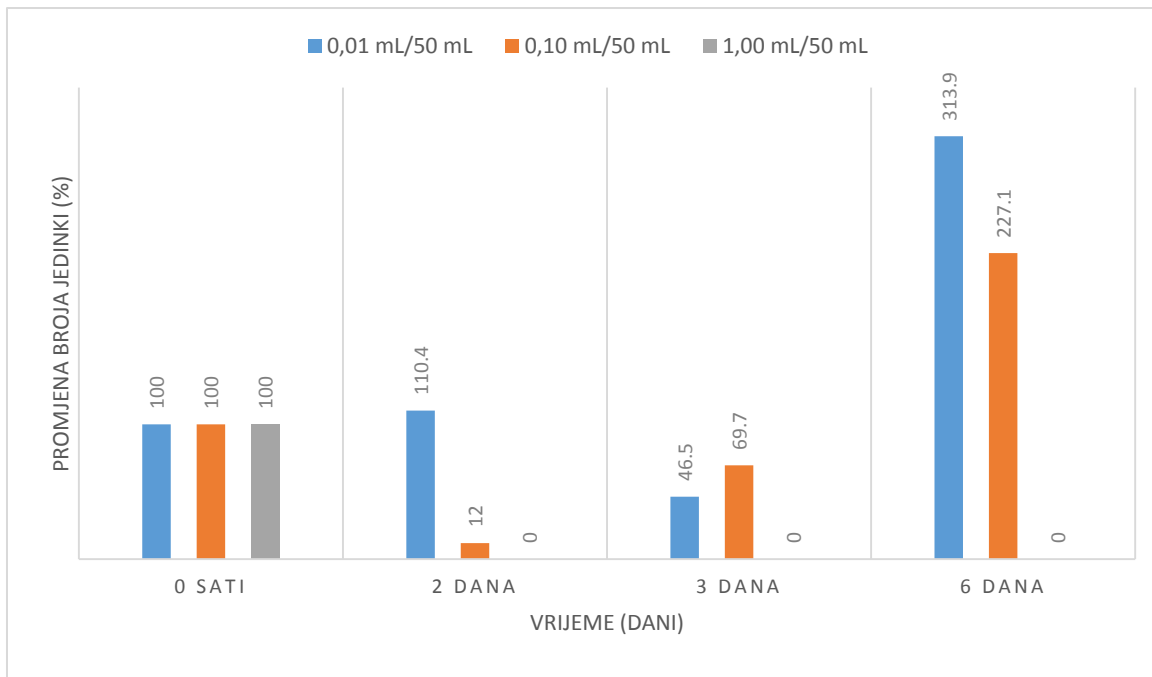
Iz Tablice 4 vidljivo je da su acetofenon i mezitil-oksidi imali najtoksičniji učinak na vrstu *D. forcipatus*. Naime, volumni omjer od 0,1 i 1,0 mL/50mL već su drugog dana pokusa uzrokovale ugibanje svih jedinki (Slike 2, 3 i 4). Slijede stiren, α -metilstiren i benzen za koje je utvrđen 100%-tni mortalitet drugog dana pokusa u najvećem volumnom omjeru, 1,0 mL/50mL (Slike 5, 6 i 7). Benzen i aceton su se pokazali najmanje toksičnim te je vrijednost broja jedinki vrste *D. forcipatus* zadnjeg dana pokusa bila veća od pokusne postavke i iznosila je 1750,0 % za benzen i 886,2 % za aceton, u odnosu na 677,9 % u kontrolnoj postavi (Slike 6 i 10).



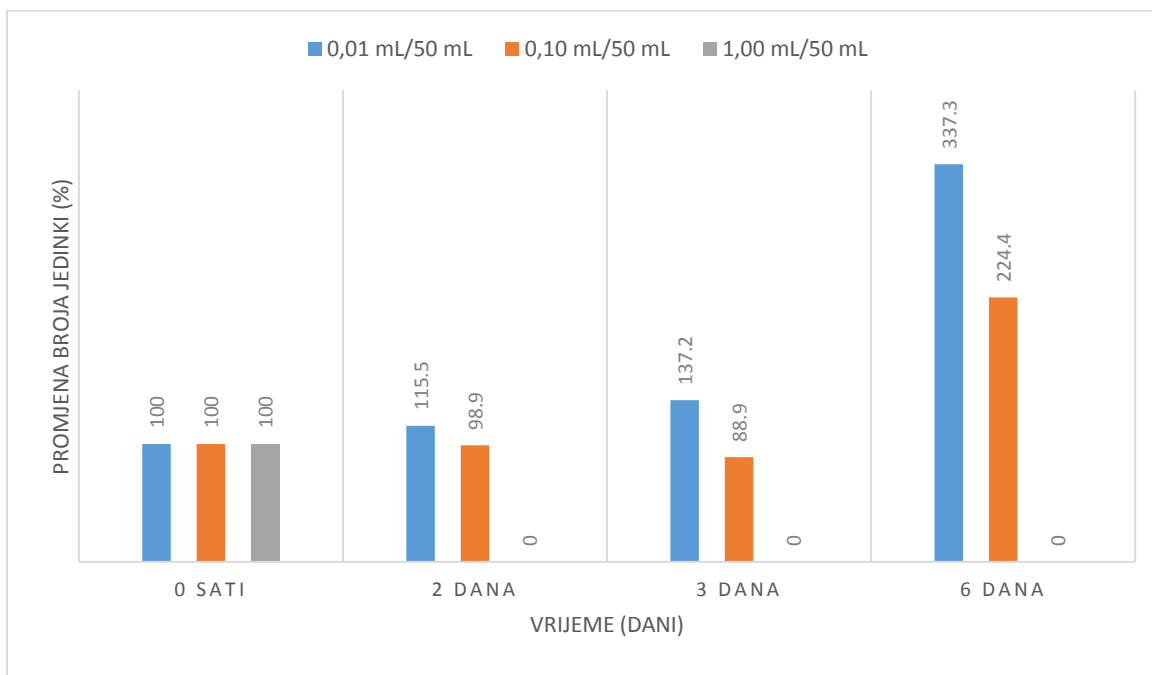
Slika 2. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem acetofenona



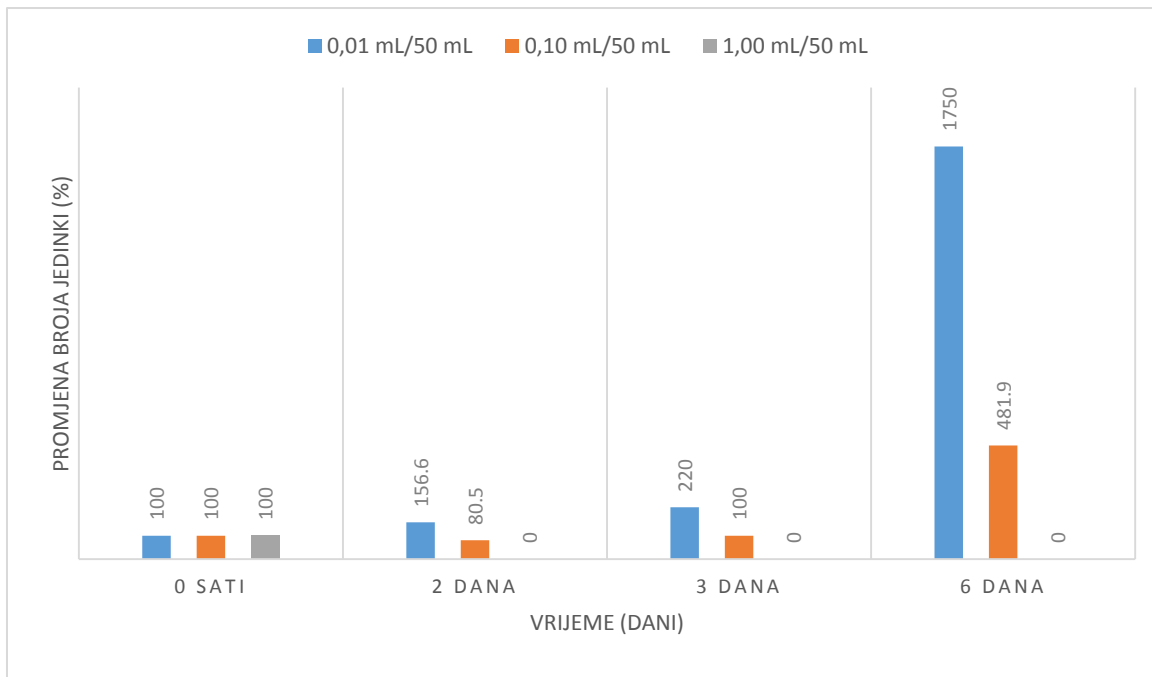
Slika 3. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem mezitil-oksida



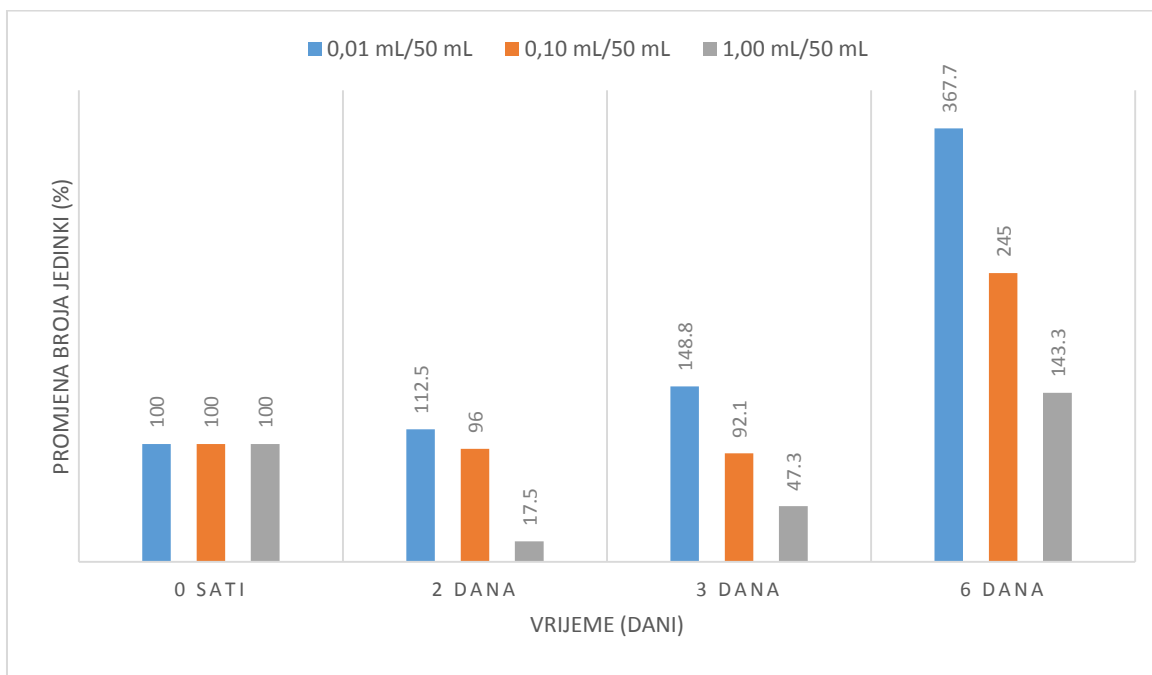
Slika 4. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem stirena



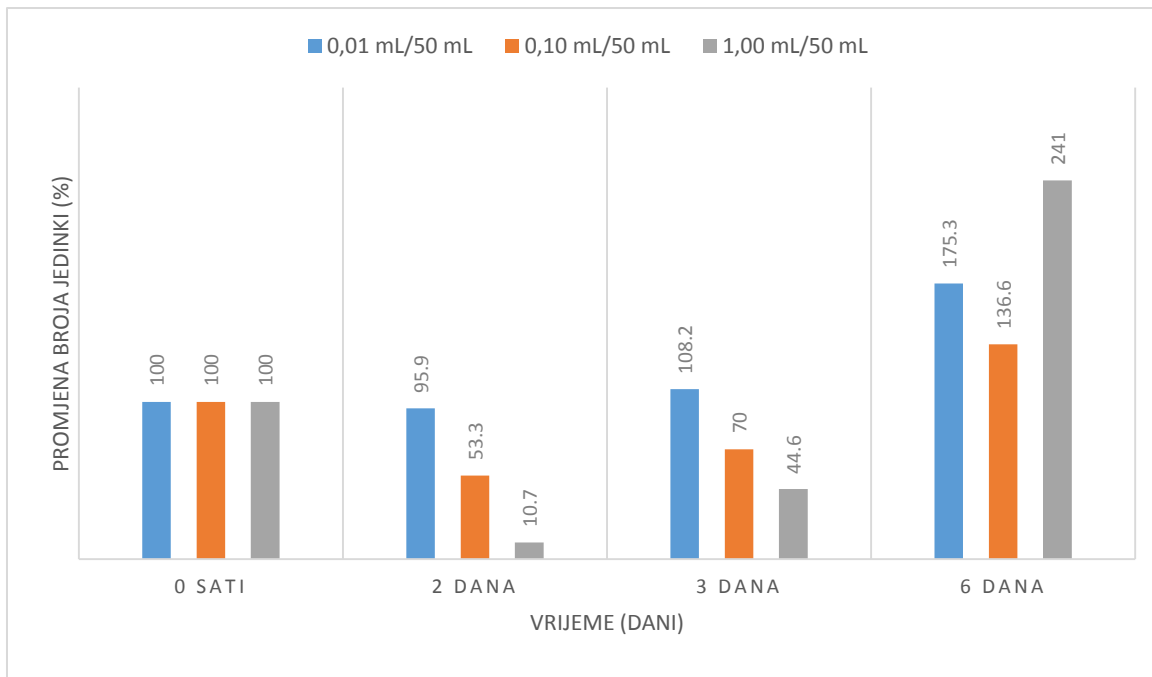
Slika 5. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem α -metilstirena



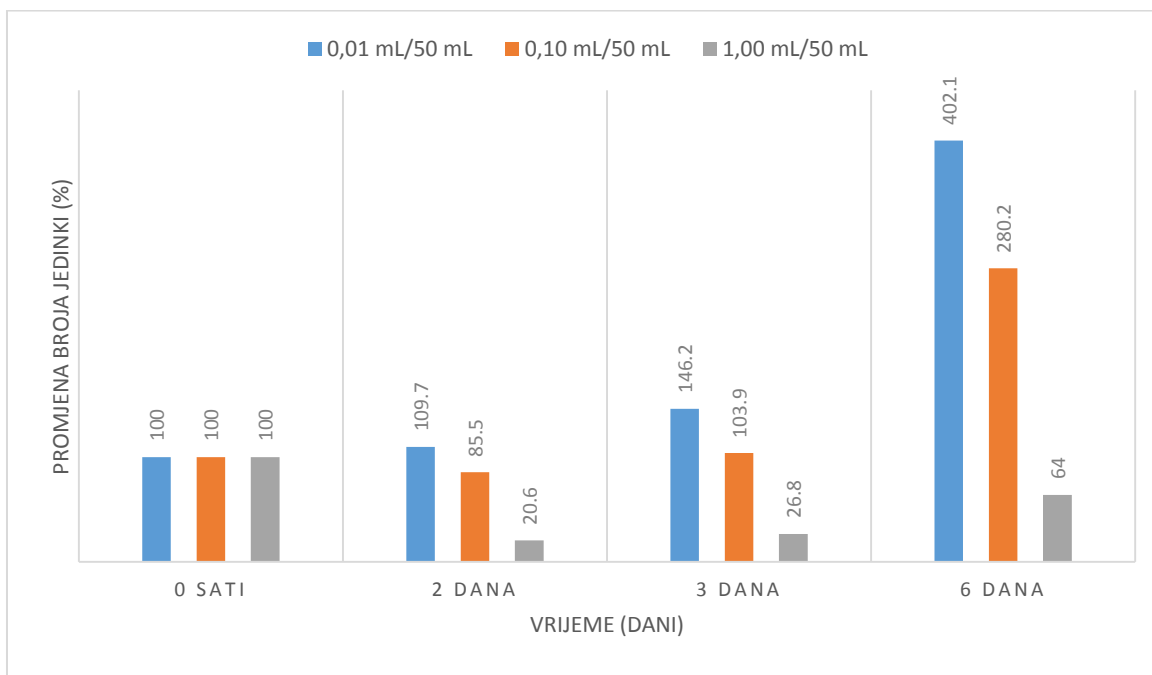
Slika 6. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem benzena



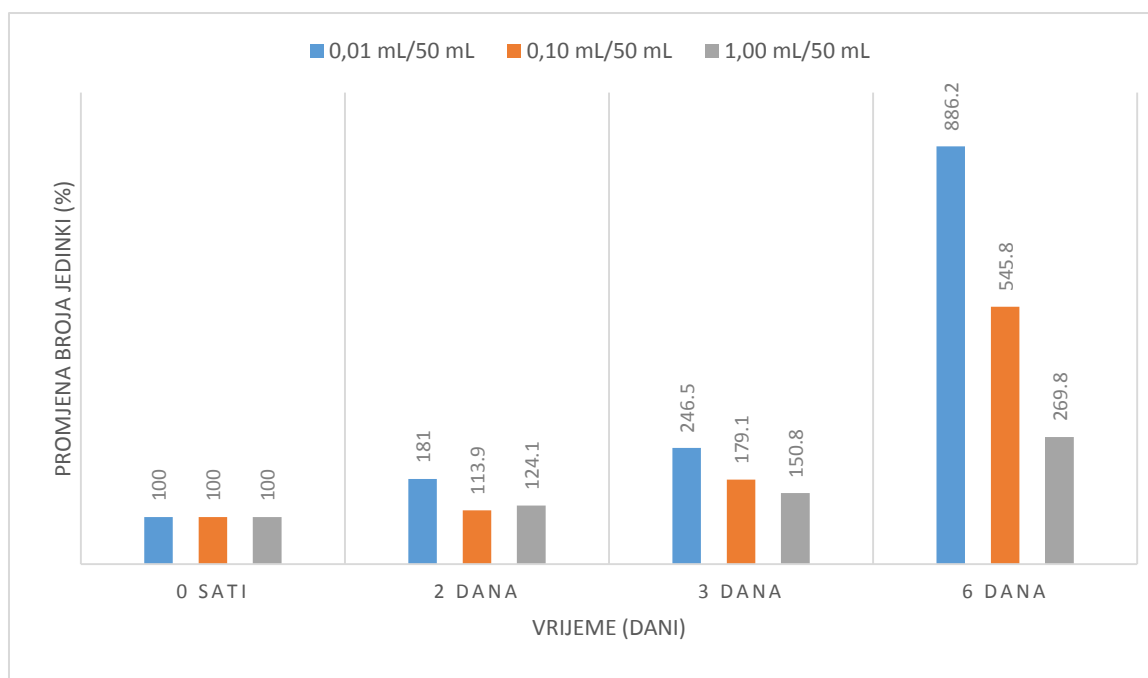
Slika 7. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem etil-benzena



Slika 8. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem kumena

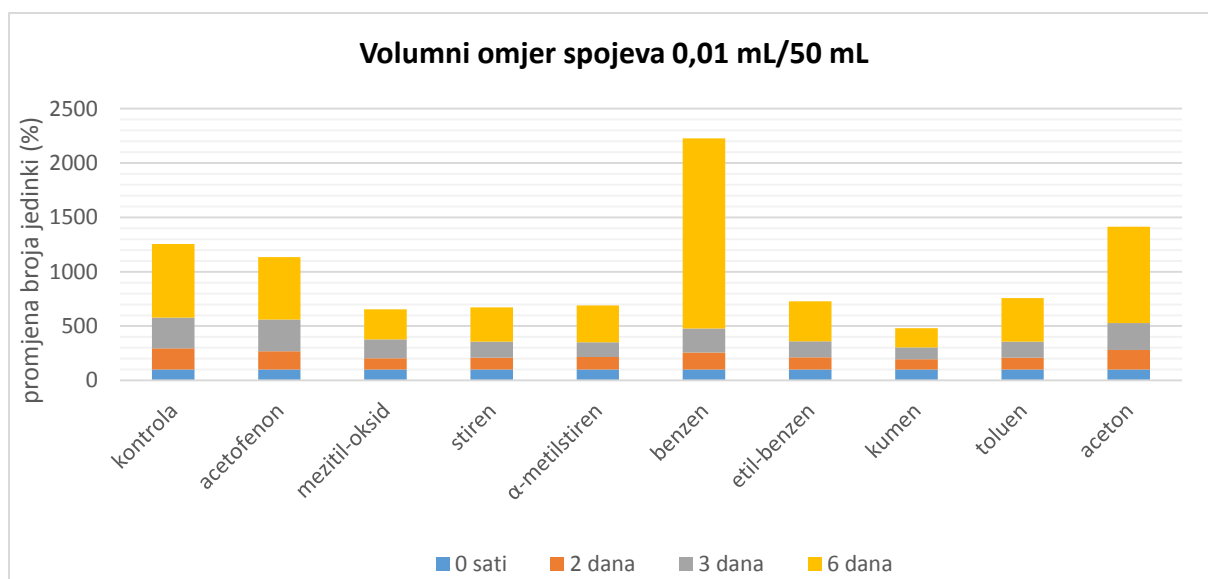


Slika 9. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem toluena



Slika 10. Promjena broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* pod utjecajem acetona

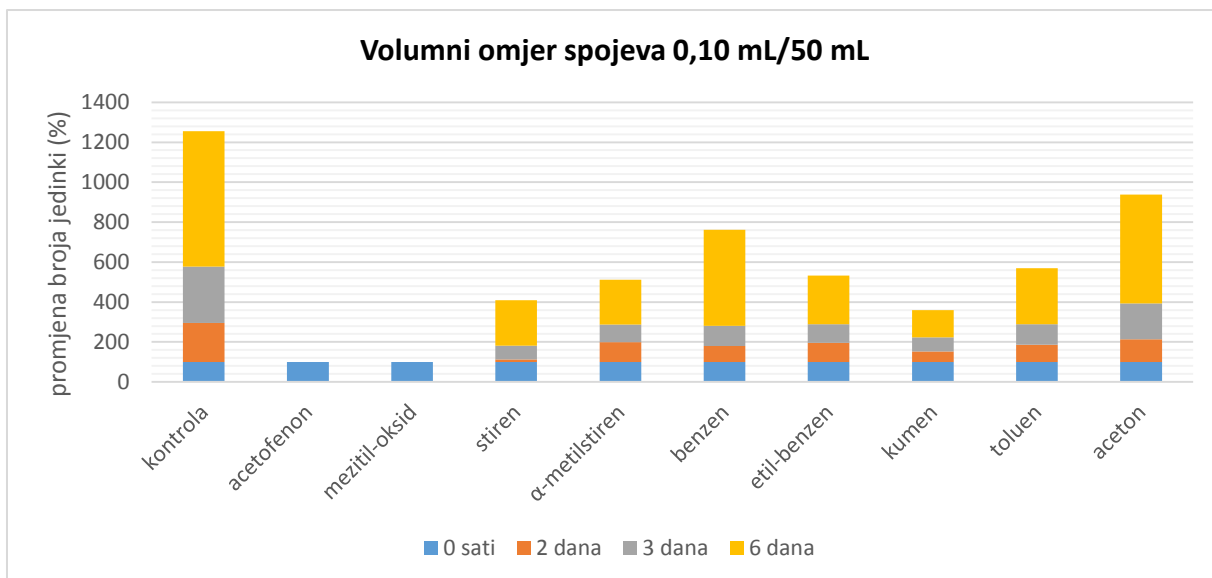
Iz usporednog prikaza promjene broja jedinki vrste *D. forcipatus* vidljivo je da kod najniže korištene volumnog omjera, 0,01 mL/50mL, samo kod kumena drugi dan pokusa uočen mortalitet jedinki odnosno, brojnost jedinki se smanjila na 95,9 % u odnosu na početnu postavu no nakon toga za sve istraživane spojeve brojnost raste i najveća je zadnjeg dana pokusa (Slika 11). Kao što je već ranije navedeno, za benzen i aceton ta je vrijednost i veća no u kontroli.



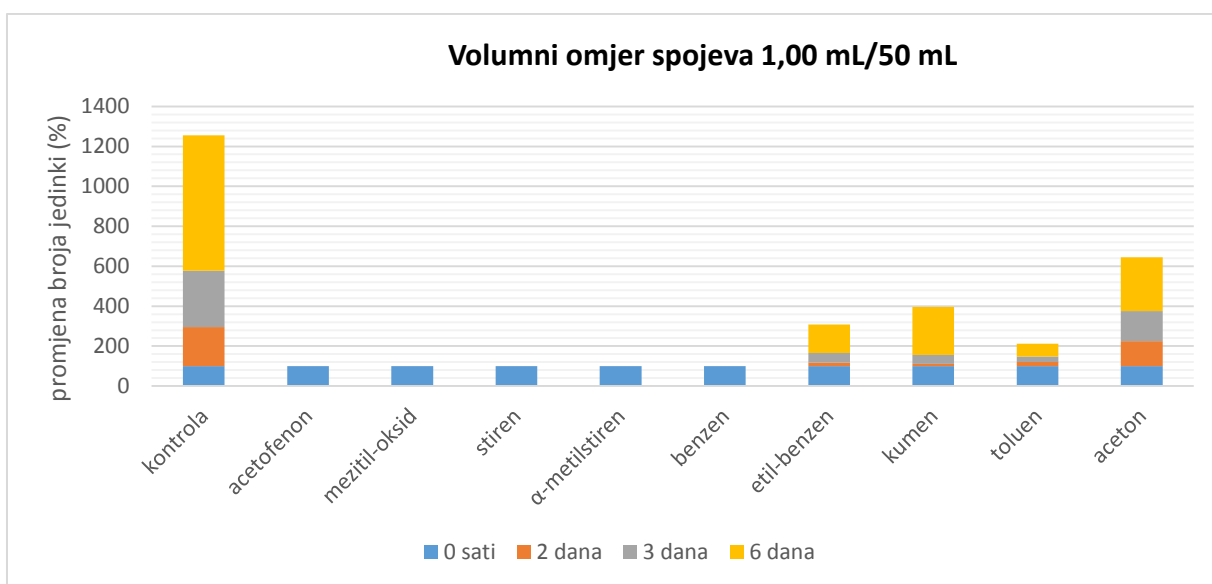
Slika 11. Usporedni prikaz promjene broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* tijekom šest dana, pod utjecajem 9 odabranih petrokemijskih spojeva volumnog omjera 0,01 mL/50 mL

Uspoređujući volumni omjer od 0,10 mL/50 mL (Slika 12) vidljivo je da su acetofenon i mezitil-oksidi već prvog dana pokusa uzrokovali ugibanje svih jedinki, a i ostali spojevi, osim acetona, doveli su do smanjenja brojnosti jedinki vrste *D. forcipatus*. Trećeg dana pokusa došlo je do rasta broja jedinki, a daljnji porast vrijednosti utvrđen je zadnjeg dana pokusa u svim pokusnim postavama u kojima su jedinke preživjele. Kao i kod prethodnog volumnog omjera i ovdje je najveći rast zabilježen kod benzena i acetona, ali te vrijednosti nisu više od kontrole.

Volumni omjer od 1,00 mL/50 mL acetofenona, mezitil-oksida, stirena, α-metilstirena i benzena (Slika 13) dovela je do ugibanja svih jedinki u pokusnim posudama. Etil-benzen, kumen i toluen uzrokovali su ugibanje više od 50 % jedinki drugog dana pokusa, a blagi porast vrijednosti uočen je trećeg dana. Trend rasta broja jedinki se nastavlja i jasno je vidljiv zadnjeg dana pokusa.



Slika 12. Usporedni prikaz promjene broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* tijekom šest dana, pod utjecajem 9 odabranih petrokemijskih spojeva volumnog omjera 0,10 mL/50 mL



Slika 13. Usporedni prikaz promjene broja jedinki vrste *Dicranophorus forcipatus* tijekom šest dana, pod utjecajem 10 odabranih petrokemijskih spojeva volumnog omjera 1,00 mL/50 mL

4. RASPRAVA

Rezultatima laboratorijskih pokusa nastojala se utvrditi osjetljivost vrste *Dicranophorus forcipatus* na odabrane organske spojeve koji se javljaju kao petrokemijski onečišćivači voda. Ta su istraživanja dopuna terenskom radu u svrhu preciznijeg određivanja toksikološke vrijednosti određenih petrokemijskih spojeva, a što je u uvjetima terenskog rada teško postići. U laboratoriju je uspostavljen kontinuirani uzgoj pokusne vrste kolnjaka *D. forcipatus*, koja je nakon dugih pokušaja izolirana kao najpogodnija za trajno održavanje u zatvorenom sustavu uzgoja. Iako je laboratorijski uzgoj obuhvaćao samo manji broj životnih uvjeta kojima je ova vrsta izložena u prirodi, ipak je bio pogodan zbog njegove jednostavnosti, što je nužno u toksikološkim testovima (Gorokhova, 2017; Larramendy, 2016). Osim toga, stalna kontrola uzgoja pokazala je da se u istraživanju toksičnosti osim mortaliteta, kao uobičajenog pokazatelja, zbog vrlo brzog razmnožavanja kolnjaka, može pratiti i njihov natalitet (Larramendy, 2016). Na toj je činjenici i temeljen način izvođenja pokusa u ovom radu jer se upravo promjenom broja jedinki određivalo djelovanje svih odabranih petrokemijskih spojeva. Pokusima je obuhvaćeno i praćeno kratkotrajno (akutno) i uvjetno rećeno dulje (kronično) djelovanje odabranih tvari na populaciju pokusnih životinja.

Prvi od istraživanih spojeva u ovom radu bio je fenol. Budući da je fenol ugljikovodik široke primjene, nerijetko se njegova koncentracija u prirodnim vodama, posebno kopnenim vodama, naglo poveća zbog čega je važno pratiti utjecaj i posljedice visokih koncentracija fenola na beskralježnjake u laboratorijskim uvjetima (Wetzel, 1969; Mahammedilyas Basha i sur., 2010). To je razlog zašto su u ovom radu odabrane koncentracije fenola od 10 do 400 mg/L. Negativno djelovanje fenola pokazalo se već prvog dana pokusa, pojavom visokog mortaliteta pokusnih životinja i to već kod najniže koncentracije od 10 mg/L. Koncentracija od 200 mg/L bila je letalna za više od 50 % jedinki već prvog dana pokusa, no nakon toga do kraja šestog dana pokusa dolazi do oporavka, odnosno povećanja nataliteta populacije kolnjaka. Slično djeluju i više koncentracije fenola u vodi (300 i 400 mg/L), snažno toksićno na početku, a potom sve slabije s duljinom trajanja pokusa. Fenol je poznat kao karbolna kiselina koja je nekad služila kao sredstvo za dezinfekciju jer je jak oksidans. Vjerojatno na tom principu djeluje i na druge životinje, posebno beskralježnjake, pa tako i na kolnjake.

Osim mortaliteta i nataliteta kolnjaka, tijekom pokusa je praćena i promjena koncentracije fenola. Naime, poznato je da je promjena koncentracije ispitivanog spoja neposredno vezana uz aktivnost bakterija, koje su ujedno uključene u životni ciklus kolnjaka kao njihova hrana

(Meadow i Barrows, 1971). Osim toga, promjena koncentracije ispitivane tvari može podjednako biti i rezultat njezina hlapljenja, posebno ako se radi o lako hlapljivoj tvari. Stoga se može zaključiti da oporavak pokusnih životinja nije posljedica smanjene toksičnosti, već smanjenja koncentracije fenola u vodi kao posljedica njegova hlapljenja (Mahammedilyas Basha, 2010).

Osim fenola u ovom je radu istraženo djelovanje još 9 hlapljivih aromatskih ugljikovodika. Prema djelovanju na kolnjake ove se spojeve može svrstati u tri skupine.

U prvoj su skupini acetofenon i mezitil-oksidi koji pokazuju visoku toksičnost. Volumni omjeri od 0,10 do 1,00 mL/50 mL usmrćuju sve jedinke tijekom jednog dana (24 sata). Najniži dodani volumni omjer spojeva (0,01 mL/50 mL) nije prouzročila mortalitet ni nakon šest dana.

Drugu skupinu čine stiren, α -metilstiren i benzen. I ovi spojevi kod volumnog omjera od 0,1 do 1 mL/50 mL usmrćuju sve jedinke tijekom prvog dana (24 sata). Niži volumni omjer ovih spojeva (0,01 mL/50 mL), toksična je izrazitije samo u prva 24 sata, no nakon toga dolazi do oporavka populacije kolnjaka.

U treću skupinu svrstani su etil-benzen, kumen, toluen i aceton. Ni jedan od primjenjivanih volumnih omjera ovih spojeva ne dovodi do potpunog usmrćivanja populacije pokusnih životinja. Tek veći volumni omjer ovih spojeva dovode do povećanja mortaliteta u prva dva dana (48 sati). Kod acetona čak ni takvo djelovanje nije zapaženo. Sve pokusne kulture održale su se s velikim brojem živih životinja.

Opisana razlika u djelovanju ovih spojeva na pokusne životinje proizlazi iz različitog intenziteta hlapljenja tih spojeva (Bruce i sur., 1987; Iurascu, 2009). Što neka tvar brže hlapi, pri određenoj temperaturi, kraće djeluje na pokusne životinje. No, što je volumni omjer određenog spoja veći, potrebno je dulje vrijeme da ishlapi. Prva skupina spojeva hlapi najsporije i njihovo je djelovanje na pokusne životinje bilo najjače. Druga skupina spojeva hlapi nešto brže, a treća najbrže. Budući da su svi ovi spojevi u pravilu manje gustoće od vode, oni u većim volumnim omjerima sprečavaju aeraciju u zatvorenom sustavu uzgoja, sve dok ne ishlape te tako posredno djeluju na pokusne životinje koje ugibaju zbog nedostatka kisika (Mc Lelland, 1991; Jones, 1996). Mehanizam neposrednog djelovanja ovih spojeva nije dovoljno istražen, iako je on iz rezultata provedenih pokusa očit i može se utvrditi različitim oporavkom pokusnih životinja kod djelovanja različitih spojeva s približno istim volumnim omjerima i brzinom hlapljenja. Poznato je da su kolnjaci jako osjetljivi na nedostatak kisika i otuda snažno posredno djelovanje ovih spojeva tijekom prva 24 sata, kada gotovo u potpunosti sprečavaju obnavljanje kisika u pokusnim postavama. Neposredno toksično

djelovanje ovih spojeva, samo je nagoviješteno rezultatima pokusa, a daljnja kompleksnija istraživanja mogla bi dati konkretnije rezultate. Slaba topljivost ovih spojeva u vodi, uzrokom je da se posljedice neposrednog toksičnog djelovanja nisu mogle uočiti u većoj mjeri.

Svi organski spojevi istraživani tijekom pokusa ili na terenu, mogu se svrstati prema vremenu negativnog djelovanja i vrijednosti volumnih omjera kod koje se njihovo djelovanje na životinje počinje primjećivati. Prema vrijednosti (visini) volumnog omjera, petrokemijski spojevi su se pokazali prilično toksični, premda brzo hlape. Pitanje je bi li lako hlapljivi petrokemijski spojevi bili jednako toksični i u prirodnim vodama, posebno tekućicama gdje je veća mogućnost aeracije, nego što je u laboratorijskom sustavu uzgoja pokusnih životinja primijenjenom u ovom istraživanju.

Rezultati pokusa potvrđuju da vrsta *D. forcipatus* dobro odražava promjene uzrokovane dodavanjem različitih tvari u njezin okoliš. To je osnovni razlog da se ona koristi kao test-organizam u toksikološkim istraživanjima voda. Osim toga, ova se vrsta lako uzgaja u laboratorijskim uvjetima i jedna je od rijetkih vrsta s mogućnošću kontinuiranog uzgoja (Larramendy, 2016). Te činjenice daju povoda za daljnju razradu postupaka s vrstom *D. forcipatus* u biotestovima te za njezinu potpunu katalogizaciju u te svrhe.

Ekperimentalni rezultati, iako provedeni u specifičnim laboratorijskim uvjetima, mogu se primijeniti i na prirodna staništa. Madhuri i sur. (2012) navode da organsko opterećenje ima sličan utjecaj na kolnjake kako u laboratorijskim tako i u prirodnim uvjetima jer je mehanizam djelovanja organskog opterećenja na kolnjake isti (velika potrošnja kisika u procesima degradacije).

Dobiveni rezultati upućuju da je korisno i važno obratiti pozornost na ove osjetljive organizme u vodama, jer su kolnjaci sposobni rano signalizirati nepovoljne promjene u vodi koje utječu na smanjenje bioraznolikosti vodenih životnih zajednica (Weisse i sur., 2013). Također je neosporno da sve veće onečišćenje voda nastalo uslijed industrijalizacije, pokazuje svoje sve snažnije djelovanje (Tušar, 2004). Tu činjenicu treba imati na umu pri analizi faune kolnjaka, bilo u tipičnim jezerskim, bilo u atipičnim brzo tekućim staništima.

5. ZAKLJUČCI

U kontroliranim laboratorijskim uvjetima obavljeno je istraživanje djelovanja fenola i devet hlapljivih aromatskih ugljikovodika na kolnjaka *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller te je zaključeno slijedeće:

1. Fenol neposredno uzrokuje mortalitet pokusnih životinja u koncentracijama većim od 10 mg/L samo u prvih 24 sata. Kod duljeg trajanja pokusa broj jedinki pokusnih životinja ponovo raste zbog opadanja koncentracije fenola u vodenoj otopini.
2. Acetofenon i mezitil-oksidi pokazali su se kao najtoksičniji među korištenim petrokemijskim spojevima u pokusima. Volumni omjer od 0,10 mL/50 mL uzrokuju ugibanje svih jedinki unutar prva 24 sata.
3. Stiren, α -metilstiren i benzen uzrokuju potpuni mortalitet pri volumnom omjeru od 1,00 mL/50 mL u prva 24 sata.
4. Etil-benzen, kumen, toluen i aceton pokazali su se kao najmanje toksični. Do mortaliteta pokusnih životinja dolazi samo u prvih 24 sata pri volumnom omjeru od 0,10 ml/50 ml, ali ne dovode do potpunog uništenja kulture ni u jednoj pokusnoj postavi.
5. Smanjena toksičnost pojedinih petrokemijskih spojeva odabranih za provođenje pokusa, posljedica je njihove velike hlapljivosti.
6. Vrsta *D. forcipatus* pokazala se kao pogodan organizam za provođenje biotestova u toksikološkim ispitivanjima vode.
7. Ako se kompleksnije želi obuhvatiti djelovanje određenih organskih tvari na pojedine organizme, toksikološki testovi bi trebali obuhvaćati složena istraživanja koja bi uključivala i promjenu broja bakterija tijekom pokusa i promjenu koncentracije/volumnog omjera korištene tvari, a što prilikom ovih pokusa nije uvijek i u jednakoj mjeri rađeno.

6. LITERATURA

Bruce, R. M., Santodonato, J., Neal, M. W. (1987): Summary review of the health effects associated with phenol. *Toxicology and Industrial Health*, **3**: 535-568.

Cho, C-W., Pham, T. P. T., Kim, S., Kim, Y-R., Jeon, Y-C., Yun, Y-S. (2009): Toxicity assessment of common organic solvents using a biosensor based on algal photosynthetic activity measurement. *Journal of Applied Phycology*, **21**: 683-689.

Dartnall, H. J. G., (2005): Are Antarctic planktonic rotifers anthropogenic introductions? *Quekett Journal of Microscopy*, **40**: 137-143.

De Morais, P., Stoichev, T., Basto, M. C. P., Vasconcelos, M. T. S. D. (2012): Extraction and pre-concentration techniques for chromatographic determination of chlorophenols in environmental and food samples. *Talanta*, **89**: 1-11.

Di Gioia, D., Barberio, C., Spagnesi, S., Marchetti, L., Fava, F. (2002): Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Archives of microbiology*, **178**: 208-217.

Elci, L., Kolbe, N., Elci, S. G., Anderson, J. T. (2011): Solid phase extractive pre-concentration coupled to gas chromatography– atomic emission detection for the determination of chlorophenols in water samples. *Talanta*, **85**: 551-555.

Erman, L. A. (1956): O koločestveniji stvarne pitania kolovratok. *Zoologische Zhurnal*, **41**: 998-1103.

Ernest, W., Doe, K., Jonah, P., Young, J., Julien, G., Hennigar, P. (1991): The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**: 1-9.

Esparcia, A. M., Miracle, M. R., Serra, M. (1989): *Brachionus plicatilis* tolerance to low oxygen concentrations. *Hydrobiologia*, **186**: 331-337.

Filho, S. J., Neumann-Leitão, S., SILVA, T. A., Melo Júnior, M. (2014): Planktonic Rotifers From A Tropical Estuary Under High Marine Influence (Passos River, Pe, Brazil), *Tropical Oceanography, Recife*, **42**:68-79.

- Gaston, K. J. (2000): Global patterns in biodiversity. *Nature*, **405**: 220-227.
- Gierczak, T., Burkholder, J. B., Bauerle, S., Ravishankara, A. R. (1998): Photochemistry of acetone under tropospheric conditions. *Chemical Physics*, **231**: 229-244.
- Gilbert, J. J. (1980): Feeding in the rotifer *Asplanchna*: Behavior, cannibalism, selectivity, prey defenses, and impact on rotifer communities. U: W. C. Kerfoot (ur.), *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. The University Press of New England, Hanover, N. H.: 158-172.
- Gilbert, J. J., Starkweather, P. L. (1978): Feeding in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. III. Direct observations on the effects of food type, food density, change in food type, and starvation on the incidence of pseudotrochal screening. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, **20**: 2382-2388.
- Gorokhova, E. (2017): Shifts in rotifer life history in response to stable isotope enrichment: testing theories of isotope effects on organismal growth. *Royal Society Open Science*, **4**: 160810.
- Greenberg, M. M. (1997): The central nervous system and exposure to toluene: a risk characterization. *Environmental Research*, **72**:1-7.
- Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011): Protista - Protozoa. Metazoa – Invertebrata. *Strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb.
- Hammerstingl, J. (1952): Untersuchungen Über die Giftigkeit von Phenol bei verschiedenen karbonat – Härtegraden der Versuchslösung auf Karpfen und Schleien. Inang. Diss. Tierärztl. Fakultät München.
- Han, T., Han, Y-S., Park, C.Y., Jun, Y.S., Kwon, M.J., Kang, S-H., Brown, M.T., (2008): Spore release by the green alga *Ulva*: a quantitative assay to evaluate aquatic toxicants. *Environmental Pollution*, **153**: 699-705.
- Harring, H. K., Myers, F. J. (1928): The Rotifer fauna of Wisconsin IV The Dicranophorinae. *Trans.Wisconsin Acad., Arts and Letters*, **23**: 667-808.
- Hulyal, S. B., Kaliwal, B. B. (2008): Water quality assessment of Almatti Reservoir of Bijapur (Karnataka State, India) with special reference to zooplankton. *Environmental Monitoring and Assessment*, **139**: 299-306.

<https://fauna-eu.org/> pristupljeno 22.08.2019.

Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D. B. (2006): Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquatic Toxicology*, **76**: 69-92.

Ibrahim, M. S., Ali, H. I., Taylor, K. E., Biswas, N., Bewtra, J. K., (2011): Enzyme catalyzed removal of phenol from refinery waste water. *Water Environment Research*, **73**:165-172.

Iurascu, B., Siminiceanu, I., Vione, D., Vicente, M. A., Gil, A. (2009): Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-Fenton process catalyzed by Fetreated laponite. *Water Research*, **43**: 1313-1322.

Jones, A., Zabel, T. (1996): Proposed Environmental Quality Standards for Toluene in Water. Final Report to the DoE. WRC Report No DoE 2986.

Kutikova, A. S. (1970): Kolovratki fauni SSSR. ANSSR. Leningrad.

Larramendy, M. (2016): Invertebrates-Experimental Models in Toxicity Screening, IntechOpen.

Liebman, H. (1960): Handbuch der Frischwasser und Abwasserbiologie II. Oldenbourg, München, 842-843, 858, 870-876, 883-889, 974, 989-1089.

Madhuri, K. P., Vaishali, S., Goldin, Q. (2012): Occurrence of Rotifers and its Relation to the Water Quality during the Bioremediation process in Lake Kacharali, Thane, MS, India, *Journal of Biological Science*, **1**(3):54-58.

Mahammedilyas Basha, K., Rajendran, A., Thangavelu, V. (2010): Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, **2**: 219-234.

Martin, I. D., Mackie, G. L., Baker, M. A. (1993): Control of the biofouling mollusc, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia), with sodium hypochlorite and with polyquaternary ammonia and benzothiazole compounds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **24**: 381-388.

Matoničkin, I., Erben, R. (1994): Opća zoologija, Školska knjiga, Zagreb.

Mc Lelland, S. P. (1991): The benzene – examining California ground – water quality surveys Discussion. *Ground Water*, **29**: 434-435.

- Meadow, D., Barrows, H. (1971): Studies on Ageing in a bdelloid rotifer. The Effect of Culture system on Longevity and Fecundity. *Journal of Experimental Zoology*, **176**: 303-314.
- Miracle, M. R., Serra, M. (1989): Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics, *Hydrobiologia* **186/187**:81-102.
- Mohammadi, S., Kargari, A., Sanaeepur, H., Abbassian, K., Najafi, A., Mofarrah, E. (2015): Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalination and Water treatment*, **53**: 2215-2234.
- Moser, M., Weisse, T. (2011a): Combined stress effect of pH and temperature narrows the niche width of flagellates in acid mining lakes. *Journal of Plankton Research*, **33**: 1023–1032.
- Moser, M., Weisse, T. (2011b): The outcome of competition between the two chrysomonads *Ochromonas* sp. and *Poterioochromonas malhamensis* depends on pH. *European Journal of Protistology*, **47**:79–85.
- Munjko, I. (1971-72): Utjecaj otpadnih voda na kvalitetu podzemnih voda uz prilog poznavanju biooksidacije fenola. *Zaštita materijala*, **19**: 159-161.
- Narodne novine, broj 137/08: Uredba o opasnim tvarima u vodama, http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_80_1681.html?
- Nogrady, T., Rowe, T. L. A. (1993): Comparative laboratory studies of narcosis in *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, **255**: 51-56.
- Nogrady, T., Wallace, R. L., Snell, T. W. (1993): Rotifera, Vol. 1. Biology, ecology and systematics. U: Nogrady, T., Dumont, H. (ur.). *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. The Hague: SPB Academic Publishing BV.
- Padilla-Sanchez, J. A., Plaza-Bolanos, P., Romero-Gonzalez, R., Barco-Bonilla, N., Martinez-Vidal, J. L., Garrido-Frenich, A. (2011): Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, **85**: 2397-2404.
- Pawlisz, A. V., Peters, R. H. (1993): A test of the equipotency of internal burdens of nine narcotic chemicals using *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, **27**: 2801-2806.

- Peng, J. F., Liu, J. F., Hu, X. L., Jiang, G. B. (2007): Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1139**: 165–170.
- Pollard, S., Adams, J. A. (1988): Artificially induced metamorphosis acetone in *Acris gryllus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **17**: 419-428.
- Pourriot, R. (1965): Recherches sur l'ecologie des Rotiferes. *Vie Milieu*, **21**:7-224.
- Pourriot, R., Rougier, C. L., (1975): Dynamique d une population experimentale de *Brachionus dimidiatus* (Bryce) (Rotifere) en fonction de la nourriture et de la temperature. *Annales de Limnologie*, **11**: 125-143.
- Rathbun, R. E., Stephens, D. W., Shultz, D. J. (1982): Fate of acetone in water. *Chemosphere*, **11**: 1097-1114.
- Rathbun, R. E., Stephens, D. W., Tai, D. Y. (1991): Fate of acetone in an outdoor model stream with a nitrate supplement, southern Mississippi, U.S.A. *Journal of Hydrology*, **123**: 225-242.
- Rosenberg, N. (1989): Nervous system effects of toluene and other organic solvents. *Western Journal of Medicine*, **150**: 571-572.
- Rothhaupt, K. O. (1990): Population growth rates of two closely related rotifer species: effects of food quantity, particle size and nutritional quality. *Freshwater Biology*, **23**: 561-570.
- Saksena, D. N. (1987): Rotifers as Indicators of Water Quality, *Clean Soil Air Water*, **15**(5):481-485.
- Salt, G. W. (1987): The components of feeding behavior in rotifers. *Hydrobiologia*, **147**: 271-281.
- Segers, H. (2007): Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, **1564**: 1-104.
- Skaramuca, B. (1994): Značenje rotatorija (*Brachionus plicatilis*, Müller) za akvakulturu. *Ribarstvo*, **52**: 75-89.
- Sladeček, V. (1983): Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiologia*, **100**: 169- 201.

Stemberger, R. A. (1979): Guide to the Rotifers of the Laurentian Great Lakes. USEPA600/4-79-021, US Environment and Protection Agency, Washington, D.C.

Špoljar, M., Štafa, D., Ostojić, A., Dražina, T., Matoničkin-Kepčija, R., Kralj Borojević, K., Primc, B., (2011): Tufa deposition in a karst stream as an indicator of water quality (Papuk Nature Park, Croatia), *Ribarstvo*, **69**: 137-151.

Tušar, B. (2004): Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, Croatia knjiga, Zagreb, str. 13-27, 38-40, 41-47.

Uhlik, B. (ur.) (2007): Požarno opasne, toksične i reaktivne tvari: Mezitol-oksidi, *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 56:3, A953-A956

Zakon o vodama NN 66/19, <https://www.zakon.hr/z/124/Zakon-o-vodama> pristupljeno 13.9.2019.

Yin, X. W., Niu, C. J. (2008): Effect of pH on survival, reproduction, egg viability and growth rate of five closely related rotifer species. *Aquatic Ecology*, **42**: 607–616.

Wallace, L. A. (1989): The exposure of the general population to benzene. *Cell Biology and Toxicology*, **5**: 297-314.

Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., Nogrady, T. (2006): *Rotifera 1: Biology, Ecology and Systematics*. Leiden: Backhuys Publishers.

Weisse, T., Laufenstein, N., Weithoff, G. (2013): Multiple environmental stressors confine the ecological niche of the rotifer *Cephalodella acidophila*, *Freshwater Biology*, **58**: 1008–1015.

7. ŽIVOTOPIS

Dinka Brčinović rođ. Brkić

Rođena sam 31. kolovoza 1973. godine u Slavonskom Brodu. Osnovnu školu Ivane Brlić Mažuranić pohađala sam u Slavonskom Brodu, gdje sam završila i opću gimnaziju Matija Mesić. Godine 1992. upisala sam profesorski smjer biologije i kemije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 1999. godine živim i radim u Njemačkoj. Udana sam i majka sam dvoje djece. Posjedujem vještine laboratorijskog rada stečene na fakultetu te osnovne digitalne kompetencije (MS Office). Aktivno govorim, čitam i pišem njemački jezik. Radim s djecom vrtićke i predškolske dobi pri čemu sam posebno angažirana u pripremi i provedbi terenskih nastava u prirodu te pripremanju kreativnih radionica, edukativnih igara i igrokaza vezanih uz ekološke teme. Kao volonter sudjelujem u humanitarnim radu u Hrvatskoj Katoličkoj Misiji Nürnberg i u radu s beskućnicima pri njemačkim župama St. Kunigund- St. Stefan Nürnberg. Aktivna sam članica Hrvatskog kulturnog društva Tin Ujević.