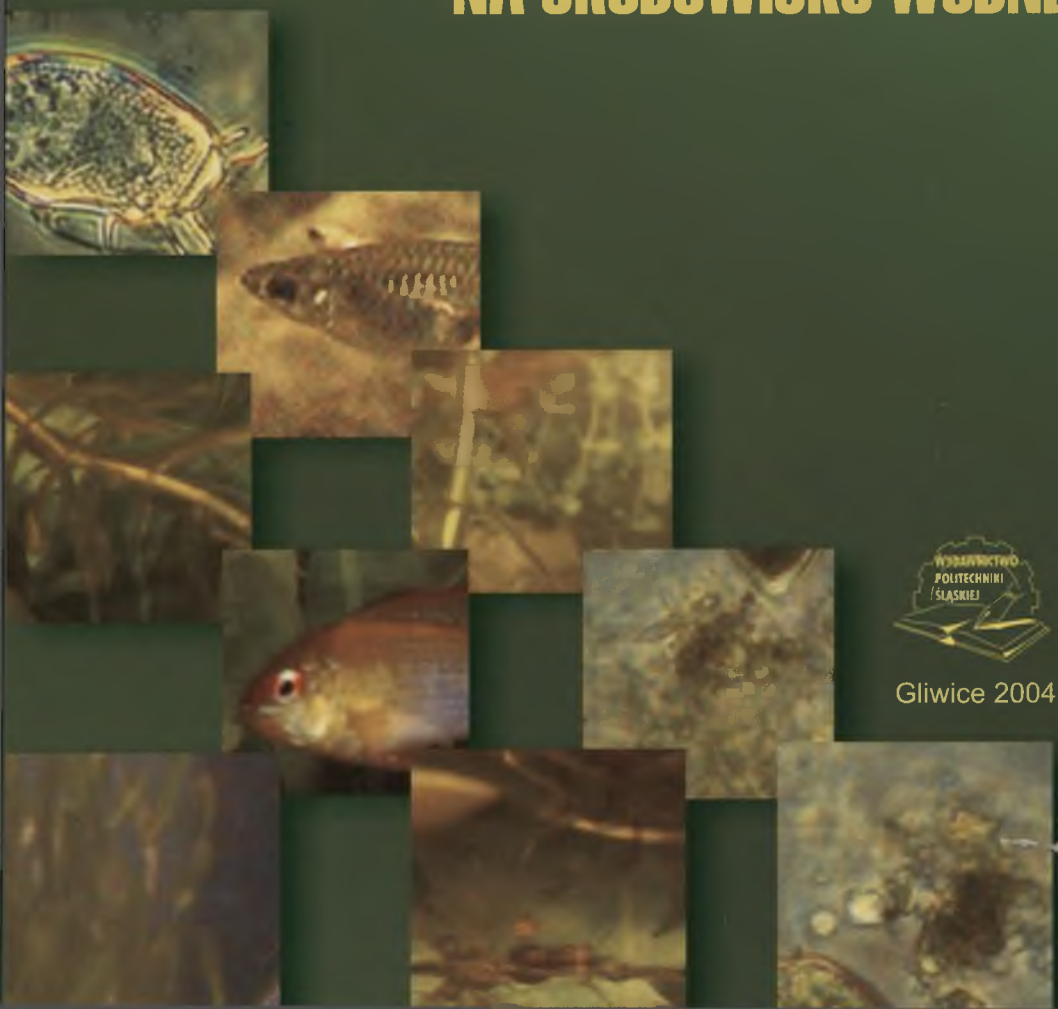
ZESZYTY NAUKOWE
POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

P.3355/04

Elżbieta Grabińska-Sota

OCENA ODDZIAŁYWANIA CZWARTORZĘDOWYCH SOLI AMONIOWYCH NA ŚRODOWISKO WODNE



WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ
Gliwice 2004

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
ZESZYTY NAUKOWE
Nr 1613

BIBLIOTEKA GŁÓWNA
P. 3355/04

Elżbieta GRABIŃSKA-SOTA

Ocena oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych na środowisko wodne

Gliwice 2004

Opiniodawcy

Prof. dr hab. Renata KOCWA-HALUCH
Prof. dr hab. Maria ŁEBKOWSKA

Kolegium redakcyjne

Redaktor naczelny – Prof. dr hab. inż. Andrzej BUCHACZ
Redaktor działu – Prof. dr hab. inż. Jolanta BOHDZIEWICZ
Sekretarz redakcji – Mgr Elżbieta LEŚKO

Redakcja

Mgr Anna BŁAŻKIEWICZ

Redakcja techniczna

Alicja NOWACKA

PL ISSN 0867-6038

Copyright by
Elżbieta Grabińska-Sota
Gliwice 2004

SPIS TREŚCI

Str.

WYKAZ SKRÓTÓW 7

1. WPROWADZENIE 9

2. PRZEGLĄD LITERATUROWY 11
2.1. Czwartorzędowe sole amoniowe w środowisku 11
2.1.1. Właściwości i zastosowanie CSA 11
2.2. Toksyczność czwartorzędowych soli amoniowych 18
2.2.1. Wpływ CSA na człowieka i inne organizmy stałocieplne 18
2.2.1.1. Metody stosowane w badaniach mutagenności substancji chemicznych 19
2.2.2. Wpływ CSA na organizmy wodne 20
2.3. Metody badania biodegradacji substancji organicznych w warunkach tlenowych 22
2.3.1. Biodegradacja czwartorzędowych soli amoniowych 27
2.4. Ocena ryzyka zagrożenia środowiska substancjami chemicznymi 29

3. ZDEFINIOWANIE PROBLEMU BADAWCZEGO 35
3.1. Cel pracy 35
3.2. Tezy pracy 36
3.3. Zakres pracy 36

4. METODYKA BADAŃ 37
4.1. Materiały badań 37
4.2. Charakterystyka stosowanych testów toksyczności i organizmów testowych 39
4.2.1. Badania zahamowania wzrostu glonów *Scenedesmus quadricauda* i *Selenastrum capricornutum* 42
4.2.2. Badanie toksyczności ostrej preparatów na rybach *Lebistes reticulatus* 43
4.2.3. Badanie toksyczności ostrej preparatów na rozwielitce *Daphnia magna* 43
4.2.4. Ocena toksyczności z zastosowaniem bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri* 44
4.2.5. Test toksyczności z zastosowaniem roślin lądowych: *Sinapis alba* i *Hordeum sativum* 44
4.3. Test genotoksyczności na zdolność do naprawy DNA u *Bacillus subtilis* 45

4.4. Metodyka badań biodegradacji czwartorzędowych chlorków z podstawnikiem alkoksymetylowym lub alkilotiometylowym testem rzecznym 46
4.4.1. Analiza widmowa ^{1}H NMR i ^{13}C NMR 48

5. ANALIZA, INTERPRETACJA I DYSKUSJA WYNIKÓW 49
5.1. Toksyczność czwartorzędowych chlorków amoniowych 49
5.1.1. Badanie toksyczności na organizmach wodnych 49
5.1.2. Badanie zahamowania wzrostu pędu i korzeni rośliny *Sinapis alba* i *Hordeum sativum* 67
5.2. Badanie genotoksyczności według testu na zdolność do naprawy DNA u *Bacillus subtilis* 74
5.3. Biodegradacja czwartorzędowych chlorków amoniowych z podstawnikiem alkoksymetylowym lub alkilotiometylowym 78
5.3.1. Mechanizm biodegradacji wybranych czwartorzędowych chlorków amoniowych 87
5.3.1.1. Analiza widmowa ^{1}H NMR i ^{13}C NMR substratów przed, w trakcie i w końcowym dniu procesu biodegradacji 88
5.4. Ocena ryzyka zagrożenia wód czwartorzędowymi chlorkami amoniowymi . 103
5.4.1. Oszacowanie ryzyka wg Schöblera 103
5.4.2. Oszacowanie ryzyka wg Bartza 107
5.4.3. Wyznaczanie bezpiecznych stężeń czwartorzędowych chlorków amoniowych w wodach powierzchniowych 108

6. PODSUMOWANIE 112

7. WNIOSKI 117

LITERATURA 119

STRESZCZENIE 142

CONTENTS

Page

ABBREVIATIONS 7

1. INTRODUCTION 9

2. LITERATURE REVIEV 11
2.1. Quaternary ammonium salts in environment 11
2.1.1. Properties and application of QAS 11
2.2. Toxicity of quaternary ammonium salts 18
2.2.1. Influence of QAS on human and other warm-blooded organisms 18
2.2.1.1. Methods of investigation of mutate properties of chemicals 19
2.2.2. Influence of QAS on aquatic environment organisms 20
2.3. Methods of biodegradation testing under aerobic conditions 22
2.3.1. Biodegradation of quaternary ammonium salts 27
2.4. Environmental risk assessment of chemical substances 29

3. DETERMINATION OF RESEARCH PROBLEM 35
3.1. Goal of research 35
3.2. Thesis 36
3.3. Scope of research 36

4. METHODS 37
4.1. Materials 37
4.2. Characteristic of applied toxicity tests and tested organisms 39
4.2.1. Inhibition of growth of algae *Scenedesmus quadricauda* and *Selenastrum capricornutum* 42
4.2.2. Acute toxicity of preparations to fish *Lebistes reticulatus* 43
4.2.3. Acute toxicity of preparations to daphnia *Daphnia magna* 43
4.2.4. Evaluation of toxicity of preparations with luminescent bacteria *Vibrio fischeri* 44
4.2.5. Toxicity test with land plants: *Sinapis alba* i *Hordeum sativum* 44
4.3. Genotoxicity rec-assay with *Bacillus subtilis* 45
4.4. Methods of determination of biodegradability of QAS with alkoxymethylo or alkylmetyl radical in river-water test 46
4.4.1. Spectral analysis ^{1}H NMR and ^{13}C NMR 48

5. ANALYSIS, INTERPRETATION AND DISCUSSION OF RESULTS 49
5.1. Toxicity of QAC with alkoxymethyl or alkylomethyl substitute 49
5.1.1. Determination of toxicity of preparations to aquatic organisms 49
5.1.2. Investigation of roots and stems inhibition with *Sinapsis alba* and *Horodeum vulgaris* 67
5.2. Determination of genotoxicity rec-assay with *Bacillus sibtilis* 74
5.3. Biodegradation of quaternary chlorides with alkoxymethyl and alkyltiomethyl substitute 78
5.3.1. Biodegradation mechanism of selected quaternary ammonium chlorides 87
5.3.1.1. Spectral analyses ^{1}H NMR and ^{13}C NMR of substrates in the beginning, during and after biodegradation process 88
5.4. Assessment of risk of QAC to aquatic environment 103
5.4.1. Risk assessment according to Schöbler method 103
5.4.2. Risk assessment according to Bartz method 107
5.4.3. Determination of no-effect concentration of QAC in surface waters 108

6. SUMMARY 112

7. CONCLUSION 117

REFERENCES 119

ABSTRACT 142

WYKAZ SKRÓTÓW

ATP	adenozynotrifosforan, nukleotyd, związek magazynujący i przenoszący energię powstającą w procesach metabolicznych; zbudowany z zasady azotowej (adeniny), cukru (rybozy) oraz trzech reszt kwasu fosforowego,
BiAS	substancja aktywna reagująca z bizmutem,
CSA	czwartorzędowe sole amoniowe,
C_{δ}	stężenie niebezpieczne dla δ frakcji gatunków,
^{13}C NMR	widmo ^{13}C NMR, widmo wykonane przy wykorzystaniu magnetycznego rezonansu jądrowego węgla,
DBAS	substancja aktywna reagująca z błękitem disulfinowym,
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy; kwas nukleinowy zbudowany z deoksyrybonukleotydów, występujący w chromosomach; zawiera informację genetyczną zakodowaną w specyficznej sekwencji nukleotydów,
EC_{50}	(*effect concentration*) - stężenie efektywne - stężenie substancji chemicznej hamujące w 50% dany proces fizjologiczny w określonych warunkach, na przykład hamowanie procesów biologicznych lub unieruchomienie organizmu, po określonym czasie ekspozycji,
^{1}H NMR	widmo ^{1}H NMR, widmo wykonane przy wykorzystaniu magnetycznego rezonansu jądrowego protonu (wodoru),
IC_{50}	(*inhibition concentration*) - stężenie inhibicyjne - stężenie substancji chemicznej powodujące 50% inhibicję aktywności fizjologicznej organizmów testowych w ściśle określonym czasie ekspozycji,
K	stała szybkości biodegradacji,
KZPC	kationowe związki powierzchniowo czynne,
LC_{50}	(*lethal concentration*) - stężenie substancji chemicznej, powodujące śmierć 50% organizmów w danej populacji po ściśle określonym czasie ekspozycji,
LD_{50}	dawka śmiertelna medialna; jest to stężenie substancji chemicznej, które

	może powodować śmierć 50% zwierząt przy różnych drogach narażenia,
MBC	(*Minimal Bactericidal Concentration*), najmniejsze stężenie związku, które powoduje działanie bakteriobójcze w określonym czasie,
^{15}N MNR	widmo ^{15}N MNR, widmo wykonane przy wykorzystaniu magnetycznego rezonansu jądrowego azotu,
NOEC	(*no observed effect concentration*) - najwyższe stężenie toksykanta, które w określonym czasie trwania badań nie powoduje żadnych spostrzegalnych zmian w organizmach testowych,
OECD	Organizacja Gospodarczej Współpracy i Rozwoju,
OWO	ogólny węgiel organiczny,
PEC	przewidywane stężenie substancji w środowisku,
PNEC	przewidywane stężenie, które nie będzie wywoływało ujemnych skutków w odniesieniu do głównych przedstawicieli łańcucha pokarmowego,
RWO	rozpuszczony węgiel organiczny,
SD	odchylenie standardowe,
t_{50}	czas połowicznego zaniku zanieczyszczeń oznacza, że w każdym okresie trwającym t_{50} dni zawartość zanieczyszczeń zmniejsza się o połowę,
WGK	współczynnik ryzyka wodnego,
WGZ	liczba ryzyka wodnego.

1. WPROWADZENIE

Zagrożenie dla środowiska ze strony związków chemicznych i racjonalna gospodarka tymi związkami to problemy, które we współczesnym świecie stanowią ważny element w kształtowaniu zarówno polityki przemysłowej, jak i polityki ekologicznej. Umiejętne postępowanie ze związkami chemicznymi przynosi z jednej strony konkretne efekty ekonomiczne, z drugiej zaś - eliminuje lub ogranicza zagrożenie dla zdrowia lub życia ludzi oraz dla środowiska przyrodniczego.

Polska stanęła przed koniecznością zbudowania, niemalże od podstaw, systemu bezpieczeństwa chemicznego. Istniejące dotychczas rozwiązania były projektowane w zupełnie odmiennych od współczesnych warunkach zarządzania państwem. Oddzielnym, niezwykle ważnym czynnikiem wymuszającym organizację systemu bezpieczeństwa chemicznego w Polsce jest konieczność dostosowania wewnętrznych regulacji prawnych do standardów Unii Europejskiej. Wydane w krajach UE Dyrektywy [22-24] wymusiły na organach państwowych w Polsce wydanie ustawy oraz zarządzenia [205,242,274] o związkach powierzchniowo czynnych (anionowych i niejonowych). W tych aktach prawnych zapisano konieczność dokumentowania podatności na rozkład biologiczny dla celów oceny ich oddziaływania na środowisko.

Obecnie prowadzone są w Komisji Unii Europejskiej dyskusje nad potrzebą uzupełnienia obecnego ustawodawstwa o dyrektywy dotyczące kationowych i amfoterycznych związków powierzchniowo czynnych. Ponadto z dniem 21.08.1997 roku weszło w życie Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej [206] w sprawie substancji chemicznych stwarzających zagrożenie dla zdrowia i życia. Zgodnie z tym rozporządzeniem nakazuje się przeprowadzenie badań biodegradacji i toksyczności substancji chemicznych celem oznakowania, etykietowania i rejestracji oraz sporządzania Karty Charakterystyki Niebezpiecznych Substancji Chemicznych. Oprócz tego Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO) opracowała i wdraża normę poświęconą systemom zarządzania środowiskiem [100]. W normie tej jako narzędzie oceny środowiska przyjmuje się między innymi ocenę ryzyka dla środowiska i ocenę różnorodnych oddziaływań na środowisko. Wyniki oceny ryzyka związanego z obecnością związku chemicznego w określonym ekosystemie stanowią

ważny element zarządzania środowiskiem. Są one podstawą podejmowania decyzji o dopuszczeniu nowych chemikaliów do stosowania, a także stanowią narzędzie selekcji i wycofywania już stosowanych związków; dają także impuls do poszukiwania nowych związków bardziej „przyjaznych dla środowiska".

Specyficzną grupę substancji chemicznych stanowią czwartorzędowe sole amoniowe (CSA), należące do grupy kationowych związków powierzchniowo czynnych (KZPC), do których odnoszą się wyżej wymienione akty prawne. W roku 1999 światowa produkcja tych związków kształtowała się na poziomie 1 mln ton [230,276] i ciągle wzrasta [6]. Substancje te są stosowane w bardzo wielu wyrobach rynkowych, ale zazwyczaj w bardzo niewielkich stężeniach, czyli podana wielkość produkcji tej grupy związków wskazuje na ich ogromne znaczenie gospodarcze. Przyczyną tak dużego zainteresowania KZPC jest szeroka gama ich właściwości użytkowych, wykazywanych w roztworach, jak: działanie antykorozyjne, antyelektrostatyczne, zmiękczające, glonobójcze, grzybobójcze, bakteriobójcze, konserwujące, oprócz innych cech typowych dla pozostałych środków powierzchniowo czynnych [276]. Tak liczne walory użytkowe wykazywane przez te substancje stwarzają potencjalną możliwość różnorodnych ich zastosowań.

CSA stosowane są w gospodarce, biotechnologii, medycynie, farmakologii, a także w produkcji biocydów [12,59,96,161,201]. Związki te są wykorzystywane między innymi do eliminacji i inhibicji wzrostu bakterii, grzybów, glonów oraz neutralizacji toksyn mikrobiologicznych, jako środki zmiękczające tkaniny, środki ochrony drewna, zbieracze w procesach flotacji, w produkcji detergentów i nawozów sztucznych, dodatki do asfaltu przy budowie dróg, w preparatach służących do dezynfekcji, a także w leczeniu chorób, takich jak np.: cukrzyca, arytmia serca, nerwice, alergie [14,25,43,170,174,199,202,221,223,227,250]. Z ostatnich doniesień wynika, że są skutecznym środkiem inaktywującym wirusa *HIV*, a także wspomagają działanie leków przeciwnowotworowych [15,42,250,261,263]. Różnorodność zastosowania powoduje duże możliwości przedostawania się ich do naturalnych odbiorników wodnych bezpośrednio bądź wraz ze ściekami bytowo–gospodarczymi, przemysłowymi lub wodami opadowymi. Tam mogą negatywnie oddziaływać na organizmy wodne, w tym rośliny wyższe, ale także podlegać procesom biologicznej i chemicznej destrukcji.

Z uwagi na powyższe celowe wydało się oszacowanie stopnia ryzyka, jakie stanowić mogą wybrane grupy czwartorzędowych soli amoniowych dla środowiska wodnego.

2. PRZEGLĄD LITERATUROWY

2.1. Czwartorzędowe sole amoniowe w środowisku

2.1.1. Właściwości i zastosowanie CSA

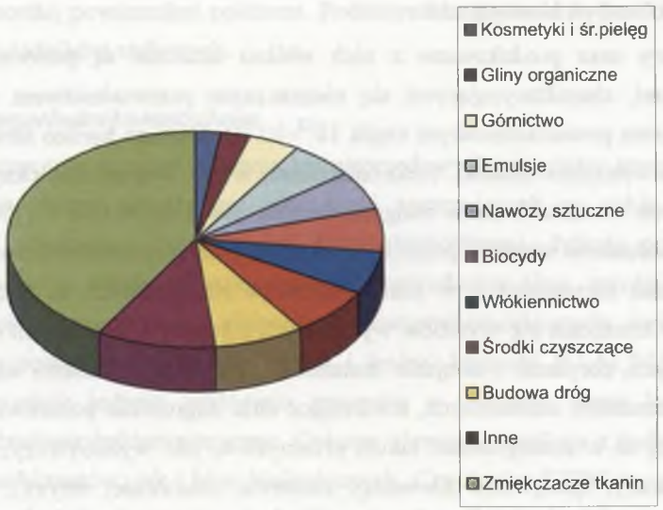
Podstawową cechą czwartorzędowych soli amoniowych jest ich silna adsorpcja na powierzchniach różnych substancji. Ze względu na budowę chemiczną adsorpcja przebiega według mechanizmu adsorpcji fizycznej i chemicznej, która zachodzi między dodatnio naładowanym atomem azotu i elektroujemną powierzchnią. Związki te mają budowę polarną. Grupa kationowa jest lipofilna i wskutek tego nadaje związkom tego typu wysoką aktywność powierzchniową. Aktywność ta przejawia się w dodatniej adsorpcji i obniżeniu napięcia powierzchniowego na granicy faz. Elementem hydrofilowym w tych związkach jest grupa amoniowa, natomiast element hydrofobowy stanowi długi łańcuch węglowodorowy. Z długością jego wiąże się rozpuszczalność związków w wodzie, która maleje ze wzrostem ilości węgli w łańcuchu. W miarę wydłużania się łańcucha zwiększa się również tendencja do tworzenia, w bardziej stężonych roztworach, skupisk związków wewnątrz cieczy. Skupiska te to wielocząsteczkowe agregaty zwane micelami. Powstają one samorzutnie, przez połączenie się większej liczby cząsteczek, gdy przekroczone zostanie określone graniczne stężenie roztworu zwane krytycznym stężeniem micelarnym (CMC). Po osiągnięciu tego stężenia dalsze jego zwiększanie nie zmienia już właściwości roztworu.

Czwartorzędowe sole amoniowe mają również zdolności zwilżające, pianotwórcze, emulgujące i dyspergujące. W związku z wymienionymi właściwościami szeroko stosowane są jako zbieracze w procesach flotacji w górnictwie i w przemyśle naftowym do usuwania z powierzchni morza produktów naftowych [164,276]. W przemyśle włókienniczym używa się ich przy impregnowaniu tkanin, matowieniu włókien, jako stabilizatorów barwników oraz jako czynników ułatwiających proces farbowania [164,226]. Dodatek CSA w ilości 2% do asfaltu w zdecydowany sposób poprawia jego zdolności wiązania się z kruszywem oraz powoduje, że jest bardziej odporny na niekorzystne działanie warunków atmosferycznych i na ścieranie

powierzchni przez intensywny ruch kołowy [17,227], stąd na dużą skalę stosuje się je w budowie dróg. Istniejące plany budowy autostrad na terenie Polski spowodują zapewne zwiększenie ich produkcji. CSA stabilizują emulsje halogenków srebra na papierze fotograficznym, dodaje się je także do kąpieli wywoływaczy dla poprawy zwilżania [164]. Przy produkcji nawozów sztucznych dodanie ich zapobiega zbrylaniu tych produktów [70]. Znajdują także duże zastosowanie w hydrometalurgii. Technika hydrometalurgiczna jest szeroko stosowana w produkcji miedzi, kobaltu, niklu, wolframu, wanadu i uranu. Światowa produkcja uranu w 85% oparta jest na ekstrakcji za pomocą czwartorzędowych soli amoniowych [17]. Wykazują także właściwości antykorozyjne. Używane są jako inhibitory korozji metali w wodzie, w układach chłodniczych, w roztworach kwasów, w ropie naftowej i w produktach jej przeróbki [25]. Modyfikują proces elektrokrystalizacji w kąpielach galwanizacyjnych [197]. Elektrokrystalizacja metali pozwala uzyskać warstwy wierzchnie spełniające następujące kryteria użyteczności: ochrona przed korozją, zmniejszenie współczynnika tarcia trących powierzchni, zwiększenie odporności powierzchni na ścieranie, zwiększenie przewodnictwa powierzchni, zwiększenie zdolności lutowniczych powierzchni, zwiększenie połysku (otrzymanie powłok dekoracyjnych), zwiększenie twardości powierzchni, zmniejszenie chropowatości, zwiększenie plastyczności [197].

CSA rozpuszczają się zarówno w cieczach polarnych, jak i niepolarnych i mogą przechodzić przez błony biologiczne. W związku z tym mogą być przez skórę wprowadzane do organizmów ludzkich i zwierzęcych. Dzięki wiązaniu się z takimi hormonami, jak insulina i kalcytonina, substancje te tworzą farmaceutyczne kompozycje nadające się do podawania donosowo i doustnie. Mogą być użyte w leczeniu chorób: cukrzycy, nerwic, arytmii serca [250]. Wiążąc różne antygeny i receptory, mogą modyfikować reakcje immunologiczne i zapobiegać alergii. Jednak najcenniejsze z ich właściwości użytecznych to: zmiękczające [25,59,128,199], antystatyczne [3,25,28,124,260], bakteriobójcze [15-16,90,130,175,179-181,183,258], grzybobójcze [179-181,187,189] i glonobójcze [102,207].

Główne obszary zastosowania czwartorzędowych soli amoniowych przedstawiono na rys.2.1.



Rys. 2.1. Zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych w gospodarce europejskiej [25]
Fig. 2.1. Application of quaternary ammonium salts in European industry [25]

Właściwości zmiękczające

Jedną z podstawowych właściwości CSA jest ich zdolność do zmiękczania tkanin. Proces ten polega na oddziaływaniu kationu amoniowego z grupami karboksylowymi obecnymi we włóknach tkanin, wskutek czego tkanina uzyskuje częściowy hydrofobowy charakter, wywołujący wrażenie miękkości i delikatności. Efektem dodatkowym jest zarówno skrócenie czasu suszenia z uwagi na wzrost hydrofobowości materiału, jak i uzyskanie przez niego właściwości antyelektrostatycznych. Oddziaływanie czwartorzędowych soli amoniowych z powierzchnią tkaniny eliminuje załamania materiału, co znacznie polepsza efekty prasowania. Związki te, stosowane do zmiękczania tkanin, mają długie łańcuchy alkilowe, w których średnia liczba atomów węgla przekracza 17 [17]. Mają one oprócz wyżej wymienionych cech także: łatwość dyspersji w roztworach wodnych, dobrą zdolność do łączenia z tkaninami, zdolność nadawania miękkości i puszystości włóknom bez wywoływania wrażenia śliskości, niepowodowanie zażółceń i szarzenia płukanych tkanin, zdolność nadawania płukanym tkaninom zwilżalności po obróbce, przyjemny zapach, zdolność odkażającą, łagodne działanie na skórę ludzką i brak działania korodującego na konstrukcje pralnic przemysłowych i pralek domowych. Ponadto korzystną cechą jest wywoływanie dodatkowo efektu antyelektrostatycznego [276].

Właściwości antyelektrostatyczne

Polimery oraz produkowane z nich włókna sztuczne są przeważnie stałymi dielektrykami, charakteryzującymi się nieznacznym przewodnictwem oraz bardzo dużym oporem powierzchniowym rzędu 10^{12}–$10^{16}\Omega$. Dlatego bardzo łatwo gromadzą na swej powierzchni ładunki elektrostatyczne, a ich stopień naelektryzowania w sprzyjających warunkach może osiągnąć wartość nawet do 30 000 V [198]. Zdolność skupienia ładunków utrudnia przerób, a także eksploatację dielektryków. Przejawem występowania niezmiennych w czasie ładunków elektrycznych są między innymi: wzmożenie brudzenia się wyrobów wykonanych z tworzyw sztucznych oraz włókien syntetycznych, zbrylanie i sklejanie materiałów, przeskoki ładunków elektrostatycznych do elementów uziemionych, stwarzające duże zagrożenie pożarowe i wybuchowe. Dotyczy to w szczególności takich przemysłów, jak: wydobywczy, chemiczny i petrochemiczny, spożywczy (elewatory zbożowe, cukrownie, młyny), papierniczy, tekstylny, itp.

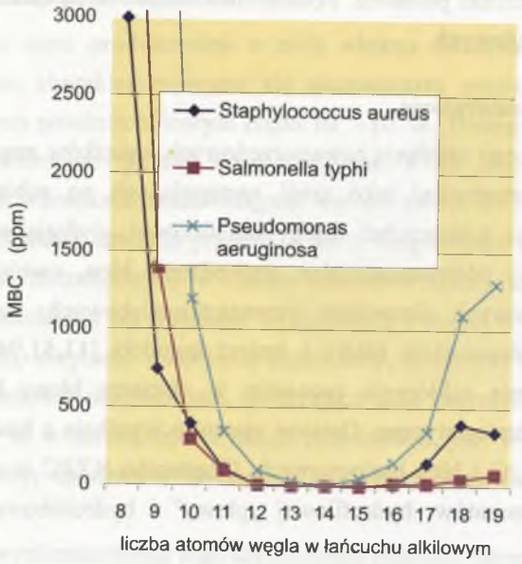
W celu wyeliminowania tego szkodliwego zjawiska opracowano szereg sposobów usuwania ładunków elektrostatycznych z powierzchni, między innymi przez dodatek tzw. antyelektrostatyków, do których należą przede wszystkim czwartorzędowe sole amoniowe [177]. Substancje te, naniesione na powierzchnię polimerów i włókien, lub wprowadzone do ich wnętrza podczas przetwarzania, wpływają na elektryczne przewodnictwo powierzchniowe i polaryzowalność otrzymanych wyrobów. Związki te stosuje się zasadniczo we wszystkich termoplastach (zwłaszcza PCW), gdzie tworzą higroskopijną warstewkę, która znacznie zwiększa przewodnictwo powierzchniowe, a tym samym umożliwia odpływ ładunków elektrostatycznych. Dodaje się je jako antyelektrostatyki do lakierów, do błon filmowych, płyt kompaktowych, włókien syntetycznych, poliamidowych i poliakrylonitrowych [164]. Najefektywniejsze w działaniu są sole amoniowe zawierające co najmniej jeden długołańcuchowy podstawnik alkilowy w cząsteczce. Tego typu związki na powierzchni polimerów zwracają się swoją częścią hydrofobową w kierunku polimeru, a częścią hydrofilową na zewnątrz. Obecność grup hydrofilowych sprzyja absorpcji wody z powietrza, a ponieważ sole amoniowe są substancjami powierzchniowo czynnymi, mogą zmniejszać graniczny kąt fazowy woda–tworzywo i powodować równomierne rozprowadzenie wody na jego powierzchni [198]. Maksimum aktywności obserwuje się dla związków zawierających 10-12 atomów węgla w łańcuchu alkilowym. Właściwości antystatyczne w każdej grupie związków pogarszają się ze zwiększeniem długości podstawnika alkilowego, co prawdopodobnie wiąże się ze wzrostem objętości cząsteczek, a więc zmniejszeniem liczby grup antystatycznie aktywnych przypadających na jednostkę powierzchni polimeru. Podstawniki metylowe są bardziej aktywne od ich odpowiedników etylowych.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Mechanizm toksycznego działania czwartorzędowych związków amoniowych na drobnoustroje można rozpatrywać jako sześć następujących po sobie etapów, a mianowicie: adsorpcja na powierzchni ściany komórkowej, dyfuzja przez ścianę, wbudowanie się w błony półprzepuszczalne, uszkodzenie błon, uwolnienie jonów potasu i niskocząsteczkowych elementów wewnątrzkomórkowych, wniknięcie do komórki, co powoduje denaturację białka i śmierć komórki [11,51,94,98]. Niskie stężenia powodują jedynie zakłócenia procesów w obszarze błony komórkowej, wykazując działanie bakteriostatyczne. Opisane zjawiska wynikają z budowy chemicznej, tak surfaktantów, jak i błon biologicznych. Cząsteczka KZPC w uproszczeniu składa się z dwóch elementów: hydrofilowej „głowy" i hydrofobowego „ogona" (rys.2.2).

Rys.2.2. Schemat budowy cząsteczki surfaktanta [276]
Fig.2.2. Scheme of structure of surfactant molecule [276]

W typowej cząsteczce część hydrofobową stanowi długi, najczęściej pojedynczy i nieposiadający rozgałęzień łańcuch węglowodorowy. Podobnie błona cytoplazmatyczna komórki bakteryjnej składa się z fosfolipidów, zawierających hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych. Są to zarówno kwasy nasycone, jak i nienasycone, o długości łańcuchów C_{16}, rzadziej C_{12},C_{14} i C_{18} [142]. Wzajemne oddziaływanie łańcuchów alkilowych soli amoniowych i cząstek fosfolipidu prowadzi do różnego rodzaju zaburzeń w strukturze molekularnej warstwy lipidowej błony, co może się objawiać zmianą jej płynności. Z przeprowadzonych badań wynika, że czwartorzędowe sole amoniowe cechują się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii gramdodatnich i nieco niższą w stosunku do bakterii gramujemnych [15]. W przypadku tych ostatnich stwierdzono także zależność aktywności bakteriobójczej od ilości atomów węgla w łańcuchu hydrofobowym.



Rys. 2.3. Wpływ ilości atomów węgla w łańcuchu alkilowym na wartość MBC (najniższego stężenia bakteriobójczego) [15]
Fig. 2.3. Relationship between the length of alkyl chain and the amount of minimum bactericidal concentration (MBC) [15]

Dla *Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* i *Pseudomonas aeruginosa* stwierdzono, że najwyższą skuteczność bakteriobójczą mają sole zawierające 12 do 16 atomów węgla w łańcuchu (rys. 2.3). Maksimum aktywności przypadało na łańcuch C_{14}, co można wytłumaczyć jego wysokim powinowactwem do podstawowego składnika zewnętrznej ściany komórkowej bakterii gramujemnych – liposacharydu. Najbardziej wysunięty na zewnątrz element liposacharydu, tzw. lipid A, składa się z części cukrowej i łańcuchów kwasów tłuszczowych, zawierających zazwyczaj właśnie 14 atomów węgla [142].

Zauważono także wpływ liczby łańcuchów alkilowych na aktywność bakteriobójczą. W miarę wzrostu liczby łańcuchów alkilowych wzrasta promień jonowy kationu amoniowego, co powoduje zmniejszenie oddziaływania z błoną komórkową, a tym samym obniżenie aktywności bakteriobójczej [17]. Świadczy to o zmniejszającym się oddziaływaniu strukturalnie rozbudowanych soli amoniowych z błoną komórkową drobnoustroju i zmniejszaniu zdolności adsorpcyjnych dodatnio naładowanego kationu do ujemnie naładowanej błony komórkowej.

Związki te inaktywują skutecznie wirusy: HIV (*human immunodeficiency virus*), HSV2 (*Hermes simples wirus type 2*) oraz *Hepatitis B* [42,250,263,276]. Działają one na zasadzie uszkadzania fosfolipidowej membrany wirusów. Wykazano również, że działają na komórki guzów nowotworowych. Stwierdzono bowiem, że pH w komórkach nowotworowych jest o 1,5 jednostki niższe niż w zdrowych, zatem wprowadzenie tych związków do chorych komórek powoduje podwyższenie pH, zaburzenie transportu. Działanie ich może także polegać na przeciwdziałaniu oporności wielolekowej, co jest uważane obecnie za największy problem chemioterapii [261].

Ze względu na powyższe właściwości substancje te znalazły zastosowanie jako środki dezynfekujące w przemyśle spożywczym, w mleczarniach, browarnictwie, cukrowniach, rzeźniach, wytwórniach napojów w przetwórstwie owocowo-warzywnym do odkażania sprzętu i kadzi, w szpitalach, budynkach użyteczności publicznej [1,202,221]. W przemyśle spożywczym używane są do konserwacji produktów. Są aktywnymi składnikami odżywek do włosów, szamponów i płukanek, dzięki czemu włosy nabierają połysku, lepiej poddają się czesaniu, nie elektryzują się i są przyjemniejsze w dotyku [25,141,220]. Efektywnie zapobiegają uszkodzeniom tkanin wywołanym działalnością mikroorganizmów i owadów. Ochrona ta polega na tym, że środki te zapobiegają przyleganiu bakterii gramdodatnich i gramujemnych do powierzchni wełen, zapobiegając ich rozprzestrzenianiu [29,191]. Związki te znalazły również zastosowanie w pływalniach oraz w systemach chłodniczych do zwalczania obrostów biologicznych [25,102,207], gdyż mają tę przewagę nad innymi środkami dezynfekcyjnymi, jak chlor i lizol, że są bezwonne, stabilne podczas przechowywania i nie posiadają korozyjnych właściwości oraz swobodnie rozpuszczają się w wodzie.

Aktywność grzybobójcza

Czwartorzędowe sole amoniowe wykazują silne właściwości grzybobójcze, szczególnie przeciwko grzybom powodującym pleśnienie drewna i innych materiałów [5,256], a także przeciwko grzybom sinizny [266]. Znalazły więc szerokie zastosowanie w konserwacji drewna, obiektach budowlanych, głównie w miejscach, gdzie istnieje ryzyko kondensacji wilgoci i rozwoju pleśni, a także w leczeniu dermatologicznym, jako środki grzybobójcze w profilaktyce grzybic. Biochemizm działania związków na grzyby jest procesem na tyle złożonym, że dokładny mechanizm oddziaływania na poziomie molekularnym nie został dostatecznie wyjaśniony [269]. Najczęściej uważa się, że substancje te ze względu na polarną budowę chemiczną powodują blokadę adsorpcyjną polarnych związków proteinowych, wchodzących w skład błon protoplazmatycznych oraz protoplazmy. Przy

zetknięciu polarnych grup proteinowych wewnątrz komórki (protoplazmie) i roztworu zostaje zakłócona działalność życiowa grzybów, przy czym zakłócenie to jest tym większe, im silniej spolaryzowane są składniki komórek i preparatu toksycznego. Monomolekularne warstwy błon pólprzepuszczalnych, dzięki polarnej budowie, lipoprotein i innych białek wchodzących w ich skład, układają się w podwójne lamelle. W lipofilnej (wewnętrznej) części błony zlokalizowane są sterydy i lipidy, podczas gdy lipoproteidy i inne białka złożone (na przykład enzymy fosfolipazy czy ATP-azy) tworzą części zewnętrzne, hydrofilowe. Związki wykazujące polarną budowę mogą się łączyć z lipofilowymi obszarami cząstek monomolekularnych warstw błon półprzepuszczalnych grzybów (na przykład z fosfatydylocholiną), zaburzają przepuszczalność i biochemiczną funkcję błon [155]. Niezależnie od zmian chemicznych wywołanych w protoplazmie przez fungicyd przedyfundowany do wnętrza komórek, związki te mogą dezaktywować witaminy niezbędne do życia organizmu, wiązać mikroelementy, jak również hamować procesy utleniania w komórkach. Niekiedy substancje te mogą działać w środowisku podobnie do enzymów, wytwarzając trujące dla grzybów metabolity [269]. Wykazano, że toksyczność CSA wobec grzybów zwiększa się ze wzrostem masy cząsteczkowej (w przypadku dobrej ich rozpuszczalności), poprzez wprowadzanie wiązań podwójnych, a także aktywnych grup funkcyjnych, takich jak chlorowce, alkile, a także przy zamianie podstawnika heksylowego na cykloheksylowy [234]. Natomiast toksyczność maleje przy wprowadzeniu grup hydroksylowych, karboksylowych, aminowych i ketonowych [269] oraz przy zastąpieniu jednego z łańcuchów alkilowych grupą benzylową [232].

2.2. Toksyczność czwartorzędowych soli amoniowych

2.2.1. Wpływ CSA na człowieka i inne organizmy stałocieplne

Prowadzone badania nad toksycznością czwartorzędowych soli amoniowych wykazały, że mimo wyraźnie zaznaczonej ich aktywności bakteriostatycznej i bakteriobójczej należą one do związków o niskiej lub średniej toksyczności w stosunku do organizmów stałocieplnych. Wartość LD_{50} tych związków podawanych szczurom *per os* wynosi 50-1500 mg/kg m.c [15,35, 115,151-153,222]. Przyjmuje się, że dawka bezpieczna dla człowieka wynosi 27 mg/dobę [15]. Pomimo niedużej toksyczności mogą wywoływać poważne objawy chorobowe u ludzi zatrudnionych przy ich produkcji. U robotników stykających się bezpośrednio z tymi związkami, obserwowano po pewnym okresie występowanie zmian w płucach, rozszerzenie

naczyń krwionośnych, chroniczne zapalenie gardła, nasilającą się próchnicę zębów [64]. Stosowanie CSA jako środków grzybobójczych, środków antyseptycznych w tak różnorodnych miejscach, jak pralnie, mleczarnie, restauracje i sale operacyjne, naraża osoby tam zatrudnione na możliwe przypadkowe kontakty z tymi środkami. Najczęściej obserwowanym objawem wywołanym przez te substancje jest ich drażniące działanie na skórę rąk i błony śluzowe [35]. Przenikając przez skórę oddziałują one na białko komórkowe oraz obniżają zdolność regenerowania się naskórka. Posiadając własności emulgujące, substancje te naruszają również tkankę tłuszczową skóry, powodując jej szorstkość, zaczerwienienie, obrzęk [151]. Ponadto człowiek może ulec zatruciu spożywając skażoną nimi wodę i żywność. Pierwszymi objawami zatrucia są biegunka, trudności w oddychaniu i obrzęk płuc. Badania przeprowadzone na myszach, szczurach i świnkach morskich wykazały, że wprowadzenie CSA do organizmu powoduje zmiany w wątrobie, śluzówce, jelicie cienkim i grubym [115]. Związki te powinny więc być stosowane zgodnie z przeznaczeniem pod warunkiem zachowania szczególnej ostrożności oraz przestrzegania warunków bezpieczeństwa pracy.

Inny aspekt stanowi zagrożenie wynikające z odległych skutków długotrwałego narażenia człowieka na małe dawki tych związków. Wprawdzie nie ma doniesień literaturowych odnośnie do ich możliwości mutagennych, niemniej jednak dane o ich zdolnościach do oddziaływania z DNA [125] mogą budzić niepokój o jego uszkodzenie i wywoływanie mutacji, prowadzących do przekształceń nowotworowych.

2.2.1.1. Metody stosowane w badaniach mutagenności substancji chemicznych

Istnieje wiele odmian testów umożliwiających badanie mutagennego działania różnych związków chemicznych. Najbardziej przydatne są długotrwałe badania na zwierzętach laboratoryjnych. Czynnikami poważnie ograniczającymi zakres tych badań są wysokie koszty oraz czas ich trwania. Dlatego też do wstępnej oceny genotoksyczności związków chemicznych polecane są metody tańsze i szybsze. Wśród nich najbardziej rozpowszechnione są testy krótkoterminowe z użyciem mikroorganizmów. Testy te oparte są na założeniu, że DNA jest materiałem wszystkich żywych komórek, tak więc można przyjąć, że substancje szkodliwe dla DNA komórek bakteryjnych będą prawdopodobnie również szkodliwe dla ludzkiego DNA. Testy te nie wymagają dużych nakładów finansowych i są stosunkowo proste do przeprowadzenia. Największą ich zaletą jest możliwość przeprowadzenia doświadczeń w krótkim czasie i szybkiego oszacowania wyników. Indukowane zmiany genetyczne można zaobserwować nawet w ciągu kilku dni. Wykazują one

około 90% zgodności z klasycznymi testami działania rakotwórczego na zwierzętach dla standardowych kancerogenów [218]. Najbardziej znanym testem z tej grupy jest test Amesa, oparty na histydynozależnych mutantach szczepów *Salmonella typhimurium* [143,166]. Pozwala on na wykrycie związków powodujących tranzycje, transwersje, zmiany ramki odczytu oraz utleniaczy DNA. Jednymi z nowszych testów pozwalających na precyzyjną ilościową ocenę indukcji mutacji w poszczególnych genach komórek bakteryjnych są Umu–test [163] i SOS-Chromotest [200]. Ocena efektywności indukcji następuje przez pomiar aktywności enzymu β-galaktozydazy w hodowli narażonej na badany mutagen. Inne testy bakteryjne to test na zdolność naprawy DNA u *Escherichia coli* [204] i *Bacillus subtilis* [109]. Przeprowadza się także testy na organizmach eukariotycznych: grzybach (wykorzystuje się szczepy drożdży *Saccharomyces* oraz pleśni *Neurospora*) i muszkach owocowych *Drosophila melanogaster* [26].

2.2.2. Wpływ CSA na organizmy wodne

Czwartorzędowe sole amoniowe największe zagrożenie stanowią dla środowiska wodnego. Duże ilości tych związków trafiają tu wraz ze ściekami, mniejsze pochodzą z innych źródeł (wypłukiwane z gleb pestycydy, wymyte z drewna fungicydy). Wykazują one wysoką toksyczność wobec organizmów wodnych, zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych [43,91,120,126,127,243-246,249]. Dzięki własnościom powierzchniowo czynnym zwiększają rozpuszczalność wielu niebezpiecznych mikrozanieczyszczeń, takich jak pestycydy, tym samym ułatwiając toksynom penetrację organizmów żywych [224]. Z uwagi na silne własności glonobójcze [99] oraz wysoką toksyczność w stosunku do skorupiaków planktonowych [9] CSA wywołują poważne zaburzenia w funkcjonowaniu ekosystemów, znacznie zubożając łańcuchy pokarmowe.

Z badań [43] nad działaniem nowego preparatu grzybobójczego (produkowanego na bazie chlorku didecylodimetyloamoniowego) na kilkunastu gatunkach ryb wynika, że najbardziej wrażliwy jest biały jesiotr (*Acipenser transmontanus*), a najbardziej odporna flądra (*Platichthys stellatus*).Toksyczne działanie czwartorzędowych soli amoniowych na ryby objawia się naruszeniem struktury lipidowej komórek i tkanek. Dzięki własnościom powierzchniowo czynnym przenikają przez warstwę lipidową do jamy okołoskrzelowej i utrudniają tam procesy oddychania. Pojawiają się symptomy zamartwicy, chociaż zawartość rozpuszczonego tlenu jest wystarczająca do oddychania. Ponadto ryby w obecności tych związków tracą śluzowatą powłokę oraz wystę-

pują u nich krwawienia ze skrzeli. Dane zebrane przez Knezovicha [119,120] w badaniach na małżach, kijankach i rybach sugerują, że substancje te mają niski potencjał bioakumulacyjny, ponieważ stwierdzono śladowe ich ilości w tłuszczu i tkankach (wątrobie, nerkach) tych organizmów. Mają natomiast istotny wpływ na długość życia oraz płodność organizmów wodnych. Stwierdzono bowiem [8], że związki te znajdujące się w wodzie w stężeniach powyżej 1 ppm powodowały znaczne zmiany w cyklu życiowym ślimaka *Limnea stagnalis L.* Zmniejszały jego długość życia o 34%, powodowały zahamowanie wzrostu skorupy, a także obniżały płodność tego organizmu aż o 56%. W większości prac stwierdzono [46,118,243], że kationowe substancje powierzchniowo czynne (w przeciwieństwie do anionowych czy niejonowych) charakteryzowały się wyższą toksycznością w stosunku do skorupiaków *Daphnia magna* niż do ryb. Toksyczność ta wzrastała wraz z długością łańcucha alkilowego [56,118,248]. Jednak najbardziej wrażliwymi organizmami wodnymi okazują się glony [9,99]. Wartości IC_{50} uzyskane dla tych organizmów dla większości przebadanych związków były znacznie niższe od 1 ppm [148,149,162,244]. Mechanizm działania glonobójczego czwartorzędowych soli amoniowych związany jest z adsorpcją związku na ujemnie naładowanej błonie komórkowej i następnie dyfuzji do jej wnętrza. Po przeniknięciu przez błonę komórkową następuje uwolnienie jonów potasu oraz niskocząsteczkowych składników wewnątrzkomórkowych, a także dochodzi do zakłócenia reakcji glikolizy, wytwarzania ATP oraz procesów enzymatycznych [11,125,244-246]. Skutkiem tego jest zahamowanie wzrostu i procesu fotosyntezy [162]. W przypadku dużych stężeń może dojść do uszkodzenia i denaturacji białka. O skuteczności tego rodzaju aktywności CSA będą decydowały czynniki określone przez budowę chemiczną związku, takie jak: dopasowanie struktury głowy polarnej surfaktanta do zaatakowanego fragmentu błony komórkowej, długość łańcucha alkilowego cząsteczki surfaktanta umożliwiająca częściową penetrację przez ten łańcuch błony komórkowej oraz wnętrza komórki [276]. Najsilniejsze działanie wykazują związki, które zawierają w swojej cząsteczce trzy grupy metylowe oraz atom tlenu w łańcuchu hydrofobowym [94]. Również zwiększenie ilości łańcuchów alkilowych oraz wprowadzenie grupy benzylowej w miejsce metylowej powoduje zwiększenie toksyczności związku w stosunku do organizmów wodnych [54,56,162,209]. Marchetti podaje [9], że toksyczność kationowych związków powierzchniowo czynnych zmniejsza się ze wzrostem twardości wody, chociaż Lewis [131] nie stwierdza takiej zależności. Jest bardziej prawdopodobne, że inne czynniki, szczególnie sorpcja na zawiesinach i skłonność do tworzenia kompleksów z anionowymi substancjami powierzchniowo czynnymi, były odpowiedzialne za niższą toksyczność ostrą w wo-

dach naturalnych w stosunku do wyników uzyskiwanych w warunkach laboratoryjnych [9,127].

2.3. Metody badania biodegradacji substancji organicznych w warunkach tlenowych

Biodegradacja powszechnie rozumiana jest jako całokształt procesów mikrobiologicznego rozkładu związków organicznych [38,112]. W przypadku gdy badany związek jest całkowicie rozkładany przez mikroorganizmy z wytworzeniem dwutlenku węgla, wody, soli mineralnych i nowych składników komórkowych (biomasy), mówi się o biodegradacji całkowitej. Natomiast gdy podlega jedynie zmianom strukturalnym, na przykład następuje utrata właściwości powierzchniowo czynnych w przypadku substancji powierzchniowo czynnych, bez całkowitej mineralizacji, mówi się o biodegradacji wstępnej lub pierwotnej. Mieszane populacje mikroorganizmów bytujące w środowisku naturalnym wykazują zdolność do biodegradacji większości związków ksenobiotycznych dostających się ze źródeł antropogennych do wody i gleby. Przebieg biochemicznego rozkładu tych związków zależy od wielu czynników abio- i biotycznych, a głównie od: struktury chemicznej i stężenia substancji, rodzaju i ilości mikroorganizmów, a także możliwości ich adaptacji enzymatycznej oraz czasu trwania procesu. Stąd też wyniki badań nad szybkością biodegradacji związków organicznych w określonych warunkach doświadczalnych są niezwykle istotne do oceny ryzyka wywołanego obecnością tych związków w środowisku.

Podatność substancji na rozkład biologiczny jest ważnym kryterium w ocenie zachowania i stopnia zagrożenia środowiska, gdyż substancje ulegające biodegradacji nie są akumulowane i przez to w ujęciu długoterminowym oczekiwać można mniejszych problemów ekologicznych niż w przypadku substancji opornych na rozkład biologiczny. Istnieje cała seria normowanych metod badania podatności na biodegradację w tlenowych warunkach, uwzględniających różne aspekty procesu (*OECD, ISO, CEN*). Przeglądu metod stosowanych do oceny przebiegu biodegradacji dokonywało wielu autorów [10,31,107,112,136,220].

Najczęściej metodyki służące badaniom biodegradacji różnią się między sobą wielkością stężenia początkowego, rodzajem mikroorganizmów (populacja mieszana, czyste kultury, populacje pobrane z urządzeń technicznych lub środowiska naturalnego, wstępnie adaptowane lub nie adaptowane do rozkładu badanej substancji), sposobem zasilania hodowli substratami (jednorazowo, okresowo, półciągle, ciągle) oraz

okresem badań (od kilku godzin do kilkudziesięciu dni) [25,63,107,113,220]. Spośród kilkudziesięciu metod podawanych przez literaturę najczęściej używanymi do badania biodegradacji w wodzie substancji chemicznych są tak zwane testy odsiewające (screening tests) i potwierdzające (confirmatory tests).

W testach odsiewających (prostych z punktu widzenia stosowanej aparatury i nakładów) stwarza się ograniczoną sposobność do wystąpienia biodegradacji (rozkładu dokonują nie zaadaptowane mikroorganizmy, które dodawane są w niewielkiej ilości). Wybór przesiewowego testu biodegradowalności dla danej substancji chemicznej zależy w dużej mierze od jej własności fizycznych – rozpuszczalności, lotności, zdolności adsorpcyjnych (tabela 2.1).

Tabela 2.1

Przydatność metod badawczych [166]

Badanie	Metoda analityczna	Stosowana dla związków, które są:		
		słabo rozpuszczalne	lotne	adsorbują się
Zanikanie RWO (301 A)	rozpuszczalny węgiel organiczny	-	-	+/-
Wydzielanie się CO_2 (301 B)	respirometria; wydzielanie się CO_2	+	-	+
MITI (301 C)	respirometria: zużycie tlenu	+	+/-	+
W naczyniu zamkniętym (301 D)	respirometria: rozpuszczony tlen	+/-	+	+
Zmodyfikowane badanie przesiewowe (301 E)	rozpuszczony węgiel organiczny	-	-	+/-
Respirometria manometryczna (301 F)	zużycie tlenu	+	+/-	+

Można przyjąć, że substancja chemiczna dająca dodatni wynik w tego typu badaniu będzie szybko ulegała biodegradacji w środowisku, a zatem może być sklasyfikowana jako „wysoko podatna na biodegradację". Jeśli testowana substancja nie spełnia kryteriów, które stawiane są w testach na łatwą rozkładalność, lub istnieje potrzeba sprawdzenia, czy dana substancja zasadniczo jest rozkładalna na drodze

biologicznej, bada się rozkładalność potencjalną za pomocą testów, w których wybrano korzystniejsze warunki dla rozkładu biologicznego (przedłużenie ekspozycji badanej substancji na drobnoustroje, korzystniejszy dla badania stosunek ilości substancji do zawartości biomasy, chemiczne lub inne warunki sprzyjające biodegradacji).

Substancję dającą dodatni wynik w tego typu badaniu można sklasyfikować jako „podatną na biodegradację właściwą", ale z powodu zastosowanych sprzyjających warunków nie można zakładać jej szybkiej i pewnej biodegradacji. Substancje chemiczne usuwane w trakcie tego testu w stopniu pośrednim (20-70%) mogą tworzyć nie degradowane produkty biodegradacji, wobec czego istotne wydaje się badanie wpływu takich metabolitów na środowisko wodne.

Warunki wyżej wymienionych testów częściowo odbiegają od warunków panujących w środowisku naturalnym (wody powierzchniowe) i w oczyszczalni ścieków. Jeśli zdolność do rozkładu ma być sprawdzana w warunkach rzeczywistych, konieczne jest przeprowadzenie testu symulacyjnego. Testy takie wymagają znacznie większych nakładów finansowych.

Testy symulacyjne będą więc z reguły stały na końcu serii testowej i stosowane będą wtedy, gdy zdolność do rozkładu biologicznego substancji została właśnie udowodniona w testach statycznych, a sprawdzić należy kinetykę bądź mechanizm rozkładu w warunkach rzeczywistych.

Z danych uzyskanych w teście symulacyjnym można obliczyć kinetyczne stałe szybkości reakcji n-tego rzędu zaniku testowanej substancji oraz okresy półrozpadu. Szybkość reakcji pierwszego rzędu wyraża równanie [52,117,129,135].

$$\frac{dC}{dt} = -K \cdot C \qquad (2.1)$$

gdzie: dc/dt - zmiana stężenia substratu w jednostce czasu ($mg \cdot dm^{-3} \cdot d^{-1}$),

K - stała szybkości reakcji (biodegradacji) (d^{-1}),

C - stężenie substratu w chwili t ($mg \cdot dm^{-3}$).

Z tego równania można wyliczyć stałą szybkości reakcji (K) i czas połowicznego rozkładu (t_{50}).

$$K = 2{,}3 \cdot \bar{k} \qquad (2.2)$$

$$\bar{k} = \frac{\sum k}{n} \qquad (2.3)$$

$$\bar{k} = \frac{\sum_{n=1}^{t} \frac{\log \frac{c}{c_o}}{t}}{n} \qquad (2.4)$$

$$t_{50} = \frac{\ln 2}{K} \qquad (2.5)$$

gdzie: t_{50} - czas połowicznego zaniku zanieczyszczeń oznacza, że w każdym okresie trwającym t_{50} dni zawartość zanieczyszczeń zmniejsza się o połowę,

$\bar{k}$ - średnie nachylenie prostej,

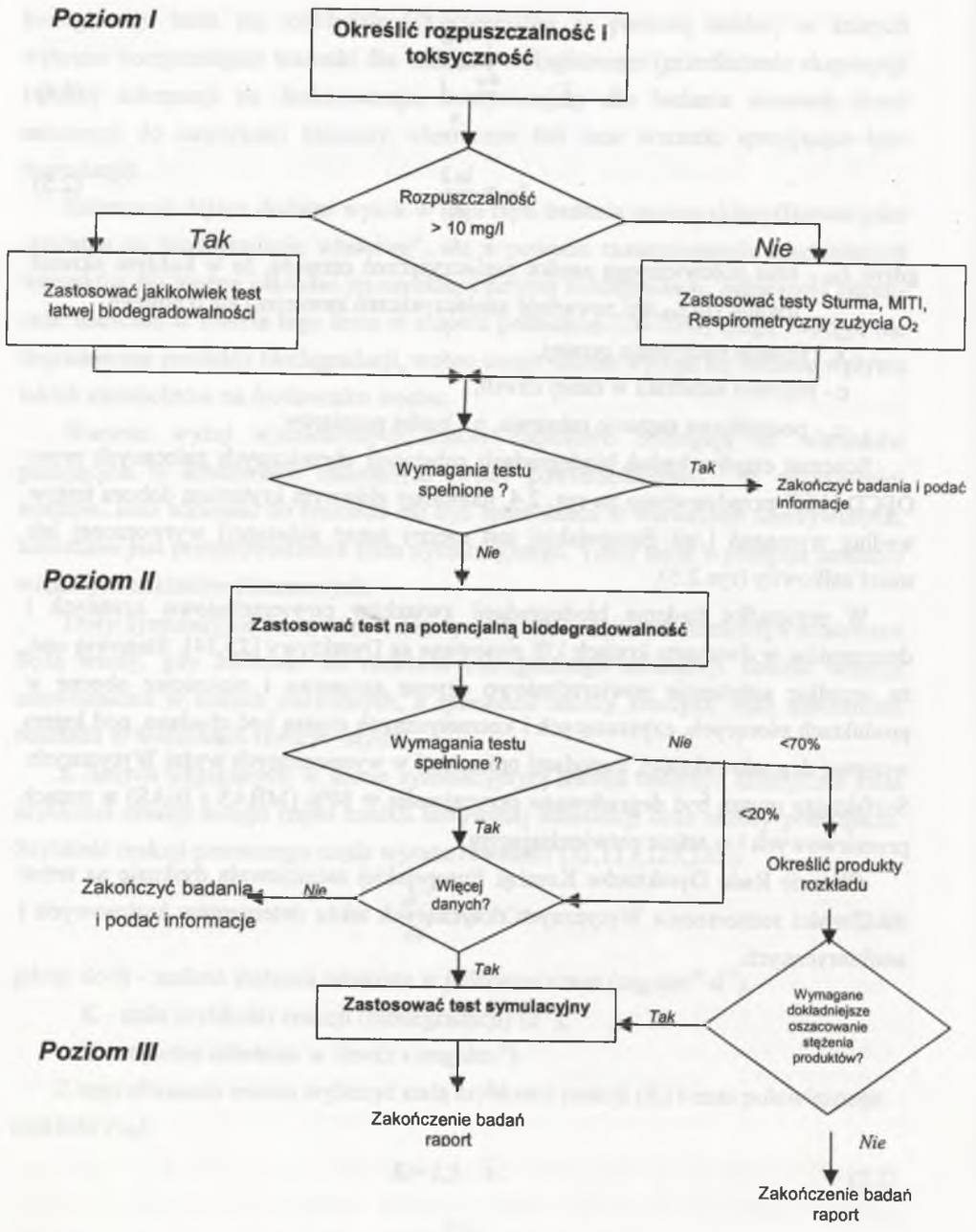
c - stężenie substratu w danej chwili,

c_o - początkowe stężenie substratu, n - liczba pomiarów.

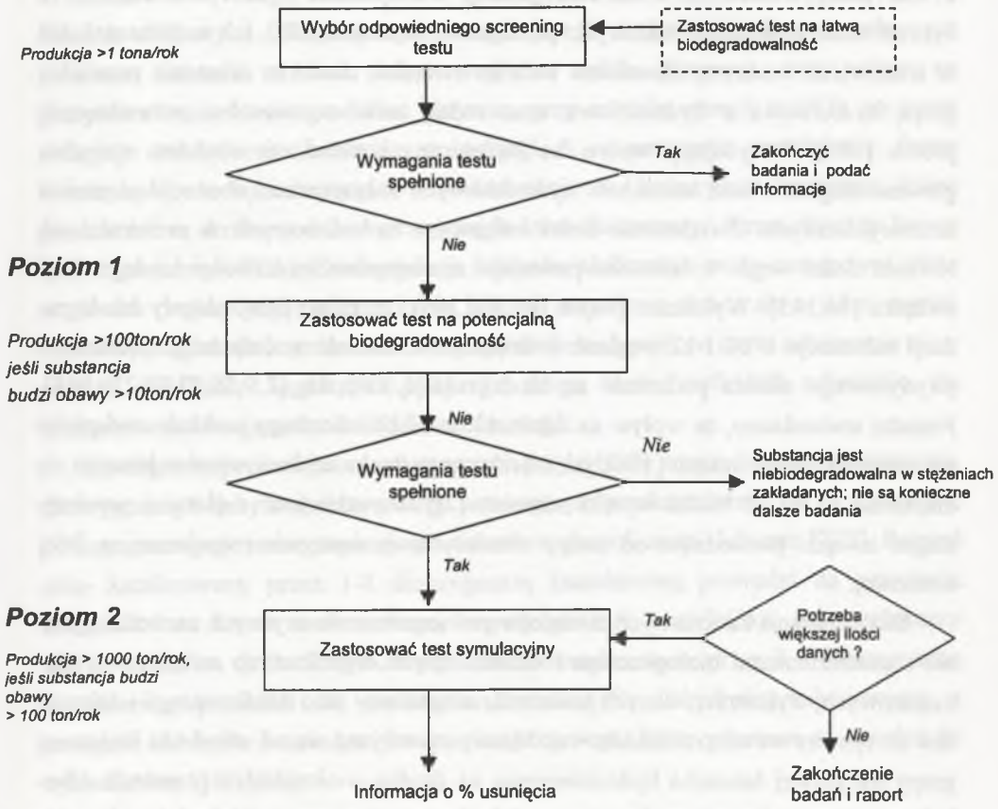
Schemat etapów badań biodegradacji substancji chemicznych zalecanych przez OECD [166] przedstawiono na rys. 2.4, natomiast głównym kryterium doboru testów według wymagań Unii Europejskiej jest roczny tonaż substancji wytworzonej lub tonaż całkowity (rys.2.5).

W przypadku badania biodegradacji związków powierzchniowo czynnych i detergentów w dwunastu krajach UE stosowane są Dyrektywy [23,24]. Stanowią one, że wszelkie substancje powierzchniowo czynne anionowe i niejonowe obecne w produktach piorących, czyszczących i kosmetycznych muszą być zbadane, pod kątem wstępnej degradowalności, metodami opisanymi w wymienionych wyżej Wytycznych. Surfaktanty muszą być degradowane przynajmniej w 80% (MBAS i BiAS) w testach przesiewowych i w teście potwierdzającym.

Obecnie Rada Dyrektorów Komisji Europejskiej zainicjowała dyskusję na temat możliwości rozszerzenia Wytycznych dotyczących także detergentów kationowych i amfoterycznych.



Rys. 2.4. Strategia OECD stosowana w przesiewowych badaniach biodegradacji
Fig. 2.4. Strategy of OECD screening biodegradation testing



Rys. 2.5. Strategia stosowana w UE w badaniach biodegradacji związków organicznych
Fig. 2.5. Strategy of EU in testing biodegradation of organics

2.3.1. Biodegradacja czwartorzędowych soli amoniowych

Zagadnieniem biologicznego utleniania kationowych związków powierzchniowo czynnych zajmowano się od dawna. Początkowo przeważała opinia, że substancje te nie ulegają biodegradacji. Sądzono tak, gdyż czwartorzędowe sole amoniowe należące do KZPC wykazywały silne własności bakteriostatyczne lub bakteriobójcze dla bakterii patogennych [188]. Pierwszymi, którzy dostarczyli dowodów, iż związki te są biodegradowalne, byli Barden i Isaac w 1957 roku [9]. Badania przeprowadzili na modelowym złożu zraszanym. Jednak najczęściej do badań wykorzystywany był model osadu czynnego [2,44,53,55,57,58,59,66,70,76,78,79,103-106,108,159,209,

219,247,265]. Donoszono o ich biodegradacji w stopniu od 0 do 100%. Zależne to było od wielu czynników, takich jak: początkowe stężenie KZPC, ich rozpuszczalność w środowisku wodnym, chemiczna budowa związku, charakter wiązania pomiędzy grupą hydrofilową a hydrofobową oraz rodzaj mikroorganizmów prowadzących proces [106]. Decydujący wpływ na biologiczny rozkład ma struktura związku, głównie długość i ilość łańcuchów hydrofobowych w cząsteczce, obecność pierścieni heterocyklicznych. Zwiększenie ilości łańcuchów hydrofobowych w molekule, jak również ilości węgli w łańcuchu powoduje zmniejszenie możliwości biodegradacji związku [56,145]. Wykazano [54,66,145,160,265], że najszybciej ulegały biodegradacji substancje o 10 i 12 węglach w łańcuchu. Obecność w cząsteczce pierścienia pirydynowego obniża podatność na biodegradację związku [2,9,56,77,79,220,248]. Ponadto stwierdzono, że wpływ na zdolność do biochemicznego rozkładu związków ma zarówno rodzaj anionu [106], jak i liczba grup tlenku etylenu wprowadzonych do cząsteczki [275]. Z badań wynika również [2], że rozkładowi najłatwiej powinny ulegać związki pochodzące od aminy oktadecylowej, następnie rzepakowej, a dalej oleinowej.

Biodegradacja kationowych związków powierzchniowo czynnych zachodzi zgodnie z mechanizmami biologicznego rozkładu innych organicznych związków wielocząstkowych, wykorzystywanych przez mikroorganizmy jako źródło energii i substratów do syntezy wewnątrzkomórkowej. Może rozpoczynać się od utlenienia końcowej grupy metylowej łańcucha hydrofobowego na drodze ω-oksydacji i powstania alkoholu pierwszorzędowego podlegającego dehydrogenacji poprzez aldehyd do odpowiadającego mu kwasu karboksylowego, który następnie jest metabolizowany szlakiem β–oksydacji poprzez octan do CO_2 i wody [220,248, 259]. Powstałe w ten sposób kwasy karboksylowe mogą też reagować z alkoholami tłuszczowymi dając estry tłuszczowe. Istnieją również dane [159], świadczące o wstępnej oksydacji łańcucha węglowodorowego do wodoronadtlenku lub wstępnym odwodornieniu, po czym następuje odpowiednio redukcja lub uwodnienie do alkoholu pierwszorzędowego, podlegającego dalszym przemianom omawianym powyżej. Obserwowano również [220,259] oksydację subterminalną rozpoczynającą się atakiem na węgiel leżący na dalszych pozycjach w łańcuchu hydrofobowym n=2 lub na bardziej centralnej pozycji. W wyniku biodegradacji powstaje początkowo drugorzędowy alkohol, następnie keton, ester oraz alkohol pierwszorzędowy i kwas octowy.

Podstawową drogą rozkładu dla kwasów tłuszczowych zawierających prosty łańcuch alkilowy o parzystej liczbie węgli jest β – oksydacja. Proces polega na skracaniu łańcucha o dwa atomy węgla w cyklu. Pierwszy etap polega na przeprowadzeniu kwasu w formę aktywną, przy udziale energii z ATP, po czym następuje odwodornienie węgla w pozycji β, a następnie uwodnienie formy nienasyconej do hydroksyacylu, odwodorowanie do ketoacylu i hydroliza, której produktami są skrócony o dwa atomy węgla kwas tłuszczowy i forma aktywna kwasu octowego (acetyloCoA). Biodegradacja łańcucha alkilowego może następować także na drodze α–oksydacji, podczas której łańcuch stopniowo skraca się o jeden węgiel. Końcowy węgiel alkilu przechodzi do grupy karboksylowej, po czym odszczepia się w postaci dwutlenku węgla [106,113]. Tą drogą może zachodzić utlenienie dla łańcuchów zawierających od 13-18 atomów węgli.

Biodegradacja pierścieni aromatycznych przy udziale enzymów monooksygenazy, dioksygenazy i dehydrogenazy polega na wstępnym przekształceniu ich do katechiny, po czym następuje rozszczepienie pierścienia w pozycji meta- lub orto [212]. Rozpad orto- katalizowany przez 1-2 dioksygenazę katechinową prowadzi do powstania kolejno kwasu cis-cis mukonowego, bursztynyloCoA, acetyloCoA, który włączany jest do przemian cyklu Krebsa. Rozpad meta- katalizowany przez 2-3 dioksygenazę katechinową prowadzi do powstania semialdehydu 2-hydroksymukonowego, a następnie aldehydu octowego i kwasu pirogronowego, które włączane są również do cyklu Krebsa [106,113].

2.4. Ocena ryzyka zagrożenia środowiska substancjami chemicznymi

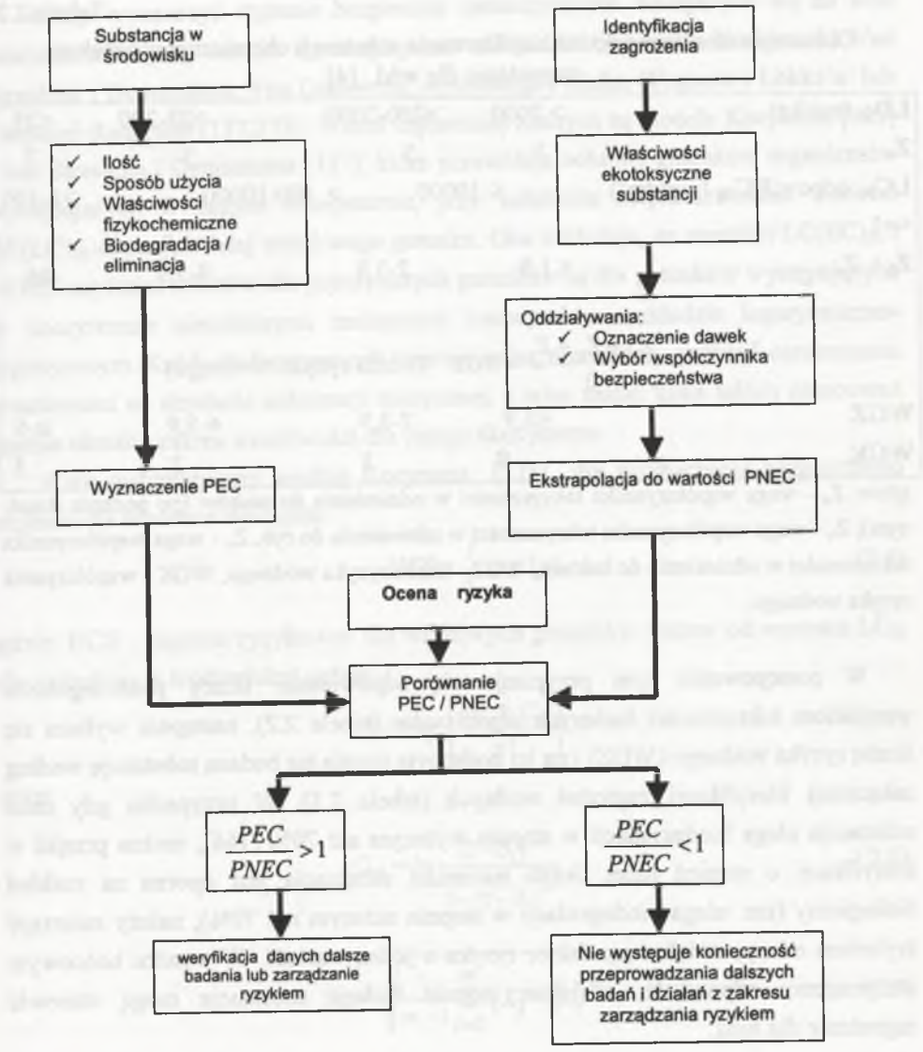
Zagrożenie dla środowiska spowodowane obecnością określonej substancji chemicznej można uważać za funkcję narażenia środowiska, toksyczności substancji chemicznej i czasu trwania narażenia. W celu właściwego oszacowania zagrożenia środowiska przez uwalnianie określonej substancji chemicznej konieczne jest posiadanie informacji, która pozwoli na ocenę jej możliwych stężeń w środowisku (występujących lub przewidywalnych) i porównaniu uzyskanych wartości ze stężeniami, nie wywołującymi ujemnego wpływu na przedstawicieli badanej biocenozy w danym ekosystemie. Taka ocena początkowo powinna zawierać informacje o stosowaniu i drogach rozprzestrzeniania się substancji chemicznej, jej właściwości fizykochemicznych oraz o charakterystyce środowiska, do którego została wprowadzona.

Znaczenie oceny ryzyka dla ochrony środowiska naturalnego jest powszechnie rozumiane i dlatego też w Unii Europejskiej opracowano dyrektywy i wytyczne, określające tryb i metody oceny progów ryzyka [37,39,40] w odniesieniu do wszystkich składników biosfery: powietrza, wód i gleb, a wyspecjalizowane agendy gromadzą dostępne dane ekotoksykologiczne, toksykologiczne i fizykochemiczne stosowanych substancji. Na podstawie obecnego stanu danych uwzględnia się przy ocenie tylko środowisko wodne. Negatywny wynik oceny prowadzi do konsekwencji administracyjnych, które w niekorzystnym przypadku mogą oznaczać ograniczenie produkcji danej substancji.

Dla oceny ekologicznej substancji potrzebne są dane dotyczące podatności na biologiczny rozkład i ekotoksyczności, tj. toksyczności ostrej i chronicznej. Dane dotyczące ekotoksyczności służą do wyznaczania przewidywanej wartości stężenia substancji w środowisku PNEC (*Predicted No Effect Concentration*), nie wywołującej szkodliwych skutków w odniesieniu do głównych przedstawicieli łańcucha pokarmowego. Wyznacza się następnie ilościową zależność między stężeniem nie wywołującym negatywnego działania na biocenozę wodną a przewidywanym stężeniem PEC (*Predicted Environmental Concentration*) tej substancji w badanym ekosystemie. Schemat procedury oceny ryzyka przedstawia rys. 2.6.

Jeśli iloraz PEC/PNEC jest mniejszy od jedności, to substancja nie stanowi zagrożenia dla środowiska; jeśli jest większy od jedności, to przedstawione na schemacie postępowanie trzeba powtórzyć, dobierając bardziej szczegółowe dane. Może to dotyczyć zarówno wartości PNEC (należy wykorzystać dane z testów toksyczności chronicznej z jednoczesnym zastosowaniem niższych współczynników bezpieczeństwa), jak i wartości PEC – w tym przypadku w procedurach symulacyjnych dobiera się coraz ostrzejsze parametry, charakteryzujące obecność substancji w środowisku.

Oceny substancji stwarzających niebezpieczeństwo dla wód można dokonać także w oparciu o wyniki badań biodegradacji oraz toksyczności wykonanych na ssakach (LD_{50}, mg/kg), rybach (LC_{50}, mg/dm^3) i bakteriach (EC_{50}, mg/dm^3) [4].



Rys. 2.6. Schemat procedury oceny ryzyka zagrożenia zanieczyszczeniem w środowisku [211]
Fig. 2.6. Scheme of procedure of environmental risk assessment [211]

Tabela 2.2

Obliczenia stosowane do zaklasyfikowania substancji chemicznej w aspekcie zagrożenia dla wód [4]

LD_{50} (mg/kg)	> 2000	>200-2000	>25-200	<25
Z_a	1	3	5	7
LC_{50} odpow.EC_{50} (mg/dm^3) <=1	< 10000	> 100-10000		>1-100
Z_b i Z_c	< 1,9	2-3,9	4-5,9	≥6
	$\frac{Z_a + Z_b + Z_c}{3} = WGZ$ (liczba ryzyka wodnego)			
WGZ	<1,9	2-3,9	4-5,9	≥6
WGK	0	1	2	3

gdzie: Z_a - waga współczynnika toksyczności w odniesieniu do ssaków (po podaniu doustnym), Z_b - waga współczynnika toksyczności w odniesieniu do ryb, Z_c - waga współczynnika toksyczności w odniesieniu do bakterii, WGZ - liczba ryzyka wodnego, WGK - współczynnik ryzyka wodnego.

W postępowaniu tym przypisuje się odpowiednie liczby poszczególnym wartościom toksyczności badanych organizmów (tabela 2.2), następnie wylicza się liczbę ryzyka wodnego (WGZ) i na jej podstawie ocenia się badaną substancję według załączonej klasyfikacji zagrożeń wodnych (tabela 2.3). W przypadku gdy dana substancja ulega biodegradacji w stopniu wyższym niż 70% [166], można przejść w klasyfikacji o stopień niżej. Jeżeli natomiast substancja jest oporna na rozkład biologiczny (tzn. ulega biodegradacji w stopniu niższym niż 70%), należy zaostrzyć kryterium oceny, zwiększając faktor ryzyka o jedną wartość. W wyniku końcowym otrzymujemy odpowiedź, w jakim stopniu badane substancje mogą stanowić zagrożenie dla wód.

Tabela 2.3

Klasyfikacja zagrożeń wodnych [4]

Współczynnik ryzyka wodnego	Skutki toksyczności substancji
WGK 0	brak zagrożenia
WGK 1	śladowe zagrożenie wód
WGK 2	wody zagrożone
WGK 3	poważne zagrożenie wód

Chcąc wyznaczyć stężenie bezpieczne zanieczyszczeń dostających się do wód powierzchniowych, stosuje się empiryczne modele statystyczne: Kooijmana, Van Straalena i Dennemana, Van Leeuwena, Aldenberga i Sloba, Wagnera i Lökke'a lub Załęskiej-Radziwiłł [137,273]. Wśród najbardziej znanych są modele Kooijmana [121] i van Straalena i Dennemana [137], które przewidują ochronę gatunków organizmów występujących w danym ekosystemie, przy założeniu nieprzekraczania wartości $EC(LC)_{50}$ dla najbardziej wrażliwego gatunku. Oba zakładają, że wartości $LC(EC)_{50}$ i NOEC uzyskane z testów dla pojedynczych gatunków są dla gatunków występujących w ekosystemie niezależnymi zmiennymi losowymi o rozkładzie logarytmiczno-logistycznym. Każdy badany gatunek stanowi jedną, niezależną „próbkę" oszacowania wrażliwości na działanie substancji toksycznej, a więc mając kilka takich oszacowań można określić zakres wrażliwości dla całego ekosystemu.

Wzór matematyczny według Kooijmana [121] dla wyznaczenia bezpiecznego stężenia dla biocenoz wodnych:

$$HCS = \frac{1}{T}\exp(\mu) \tag{2.6}$$

gdzie: HCS - stężenie ryzykowne dla wrażliwych gatunków (niższe od wartości LC_{50} dla gatunków w środowisku), gdzie:

$$T = \exp\left[\frac{3 d_m S_m C_m}{\pi^2}\right] \tag{2.7}$$

oraz:

$$C_m = \ln \frac{(1-\delta_1)^{\frac{1}{n}}}{1-(1-\delta_1)^{\frac{1}{n}}} \tag{2.8}$$

$$S_m = \sqrt{\frac{1}{m-1}\sum_{i=1}^{m}(x_1-\mu)^2} \tag{2.9}$$

x_1 - ln $LC(EC)_{50}$ dla gatunku i,

μ - średnia arytmetyczna liczb x_i,

S_m - próbkowe odchylenie standardowe wartości x_i dla *m* testowanych gatunków, tzn. m - liczba testowanych gatunków,

n - liczba gatunków zamieszkujących środowisko,

δ_1 - prawdopodobieństwo (przy znanych parametrach rozkładu), że $LC(EC)_{50}$ najbardziej wrażliwego gatunku będzie niższe niż HCS,

δ_2 - prawdopodobieństwo przeszacowania wartości HCS,

d_m- kwantyl rzędu 1 - δ_2 rozkładu zmiennej losowej S_m (tj. taka liczba, że prawdopodobieństwo, iż $S_m > d_m$, jest równe δ_2). Zwykle przyjmuje się $\delta_2 = \delta_2 = 0{,}05$.

Van Straalen i Denneman dla wyliczenia stężenia niebezpiecznego dla p% gatunków w ekosystemie założyli jako podstawę obliczeń średnią matematyczną z wartości ln(NOEC) dla wielu bioindykatorów. W przeciwieństwie do Koojmana w obliczeniach nie uwzględnili liczebności gatunków w środowisku. Według ich metody stężenie bezpieczne dla organizmów ekosystemu wodnego wylicza się według wzoru:

$$HC_p = \frac{1}{T}\exp(\mu) \tag{2.10}$$

$$T = \exp\left[\frac{3d_m S_m}{\pi^2}\ln\frac{1-\delta_1}{\delta_1}\right] \tag{2.11}$$

gdzie: HC_p - stężenie niebezpieczne dla p% gatunków,

x_i - ln(NOEC) dla gatunku i,

μ - średnia arytmetyczna wartości x_i,

S_m - próbkowe odchylenie standardowe wartości x_i dla m testowanych gatunków,

m - liczba testowanych gatunków,

δ_1 = p (jako ułamek),

δ_2 - prawdopodobieństwo przeszacowania wartości HC_p; zwykle przyjmuje się $\delta_1 = \delta_2 = 0{,}05$,

d_m - kwantyl rzędu 1 - δ_2 rozkładu zmiennej losowej S_m.

3. ZDEFINIOWANIE PROBLEMU BADAWCZEGO

3.1. Cel pracy

Aspekty bezpieczeństwa ekologicznego produktów rynkowych, zawierających czwartorzędowe sole amoniowe, powinny być uwzględniane już na etapie projektowania struktur substancji czynnych. Wyzwaniem dla producentów tych związków jest opracowanie takich wyrobów, które spełniałyby zarówno wymogi aplikacyjne, jak i ekologiczne. Za związki bezpieczne ekologiczne uznaje się te, które ulegają biologicznemu rozkładowi w określonym czasie w środowisku oraz nie są toksyczne dla organizmów bytujących w nim.

Wciąż mało jest informacji na temat szybkości i mechanizmu rozkładu biologicznego czwartorzędowych soli amoniowych w środowisku wodnym, szczególnie dotyczy to soli z układem heterocyklicznym. Jest to o tyle istotne, że wprowadzenie pierścienia, na przykład imidazoliowego, do struktury związku powoduje, że staje się on bardziej użyteczny jako preparat grzybobójczy. Zupełnie niezbadany jest aspekt działania mutagennego wszystkich czwartorzędowych soli amoniowych, a jest to istotne, gdyż istnieje możliwość przedostawania się omawianych substancji do organizmu człowieka, między innymi w postaci resztek pasty do zębów, leków, pozostałości po myciu naczyń kuchennych, zbiorników do mleka i piwa, a przede wszystkim z wodą do picia. Równocześnie w literaturze światowej brak jest opracowań dotyczących toksyczności i genotoksyczności produktów pośrednich procesu biodegradacji tych związków. Wyjaśnienie tego zagadnienia jest bardzo ważne z punktu widzenia bezpieczeństwa ekologicznego, a także ochrony zdrowia człowieka, bowiem w naszym kraju, a głównie na Śląsku, większość wód uzdatnianych do picia pochodzi z wód powierzchniowych.

W świetle tego koncepcja badawcza niniejszej pracy zakładała określenie wpływu grup funkcyjnych, szeregów homologicznych alkilowych oraz alkoksymetylowych nowo zsyntetyzowanych czwartorzędowych soli amoniowych, o wykazanych właściwościach użytkowych na genotoksyczność, toksyczność oraz mechanizm ich rozkładu w wyniku zachodzących procesów biologicznych w odbiorniku wodnym, a także oddziaływanie ich na roślinność glebową.

3.2. Tezy pracy

Kierując się przesłankami literaturowymi sformułowano następujące tezy pracy:

1. Toksyczne działanie czwartorzędowych soli amoniowych stanowi zagrożenie dla ekosystemów wodnych i zdrowia człowieka, dlatego też stężenia tych związków powinny być monitorowane zarówno w wodach powierzchniowych, jak i w ściekach dopływających do wód.
2. Istnieją różnice w mechanizmie i czasie biologicznego rozkładu i toksyczności wobec organizmów wodnych czwartorzędowych soli amoniowych z układem alifatycznym i heterocyklicznym.
3. Możliwe jest dokonanie selekcji CSA i wskazanie na związki łączące cenne właściwości aplikacyjne z bezpieczeństwem ekologicznym podczas ich stosowania.

3.3. Zakres pracy

Realizacja postawionego celu pracy oraz podanych tez wymagała:

- scharakteryzowania procesu biodegradacji w modelu wodnym, przy wykorzystaniu drobnoustrojów zaaklimatyzowanych do rozkładu badanych CSA w warunkach, gdy stanowią one jedyne źródło węgla i energii dla mikroorganizmów, oraz analizy produktów rozkładu wytypowanych preparatów na podstawie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego,
- oceny toksyczności preparatów i metabolitów pobiodegradacyjnych w stosunku do organizmów wodnych oraz wyznaczenia ich stężenia bezpiecznego w wodach powierzchniowych,
- określenia wpływu struktury związków na wzrost roślinności glebowej,
- badania genotoksyczności preparatów i metabolitów pobiodegradacyjnych.

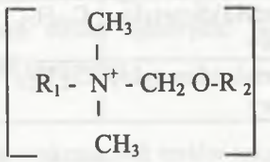
Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę zagrożenia ekosystemów wodnych czwartorzędowymi solami amoniowymi oraz wyznaczenia bezpiecznego stężenia tych związków w środowisku wodnym. Do oceny stopnia toksyczności i wyznaczenia stężenia bezpiecznego CSA służyły wyniki testów przeprowadzonych na organizmach reprezentujących łańcuch pokarmowy w ekosystemach wodnych.

4. METODYKA BADAŃ

4.1. Materiały badań

Przebadano trzy grupy czwartorzędowych soli amoniowych, różniących się bądź długością łańcucha hydrofobowego, bądź zmiennymi właściwościami części hydrofilowej.

Strukturę i własności badanych związków przedstawiono na rysunkach 4.1- 4.3 oraz w tabelach 4.1- 4.3.

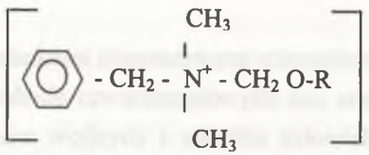


Rys. 4.1. Struktura chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych
Fig. 4.1. Structure of (alkoxymethyl)alkyldimethylammonium chlorides

Tabela 4.1

Charakterystyka chlorków alkoksy(alkilometylo)dimetyloamoniowych w zależności od rodzaju podstawnika

Nazwa i symbol chlorku		R_1	R_2	Masa cząsteczkowa g/mol	Zawartość substancji aktywnej %
A - 1	(decyloksymetylo)dimetylo-oktyloamoniowy	C_8H_{17}	$C_{10}H_{21}$	363,5	95,4
A - 2	(decyloksymetylo)dodecylo-dimetyloamoniowy	$C_{12}H_{25}$	$C_{10}H_{21}$	391,5	96,2
A - 3	dodecylodimetylo(nonyloksy-metylo)amoniowy	$C_{12}H_{25}$	C_9H_{19}	405,0	95,6
A - 4	dodecylodimetylo(oktyloksy-metylo)amoniowy	$C_{12}H_{25}$	C_8H_{17}	419,0	98,8

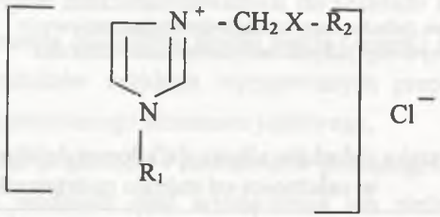


Rys. 4.2. Struktura chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych
Fig. 4.2. Structure of benzyl(alkoxymethyl)dimethylammonium chlorides

Tabela 4.2

Charakterystyka chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych w zależności od rodzaju podstawnika

Nazwa i symbol chlorku		R	Masa cząsteczkowa g/mol	Zawartość substancji aktywnej %
B - 1	benzylo(oktyloksymetylo)dimetylo-amoniowy	C_8H_{17}	313,5	95,1
B - 2	benzylo(decyloksymetylo)dimetylo-amoniowy	$C_{10}H_{21}$	341,5	98,4
B - 3	benzylo(dodecyloksymetylo)dimetylo)-amoniowy	$C_{12}H_{25}$	369,5	97,5



Rys. 4.3. Struktura badanych chlorków imidazoliowych
Fig. 4.3. Structure of study imidazolium chlorides

Tabela 4.3

Charakterystyka badanych chlorków imidazoliowych w zależności od rodzaju podstawnika

Nazwa i symbol chlorku		R_1	R_2	X	Masa cząsteczkowa g/mol	Zawartość substancji aktywnej %
I - 1	1-decylo-3-heksylo-oksymetyloimidazoliowy	$C_{10}H_{21}$	C_6H_{13}	O	358,5	84,7
I - 2	1-decylo-3-cykloheksylo-ksymetyloimidazoliowy	$C_{10}H_{21}$	C_6H_{11}	O	356,5	97,9
I - 3	1-decylo-3-heksylo-tiometyloimidazoliowy	$C_{10}H_{21}$	C_6H_{13}	S	374,5	85,6

Wszystkie badane chlorki były dobrze rozpuszczalne w wodzie w stosowanych stężeniach. Związki z grupy 1 i 3 wykazują silne działanie wobec mikroorganizmów. Są związkami bakteriobójczymi, grzybobójczymi i wykazują doskonałe właściwości antyelektrostatyczne, a związki z grupy 2 dają doskonałą powłokę w kąpielach galwanizacyjnych, w procesie niklowania i cynkowania [16,186,197,214]. Chlorki z grupy 3 to nowe fungicydy przeznaczone do ochrony drewna [186,235,238].

4.2. Charakterystyka stosowanych testów toksyczności i organizmów testowych

W środowisku wodnym przeprowadzono 5 testów toksykologicznych przy użyciu 5 bioindykatorów, reprezentantów różnych poziomów łańcucha pokarmowego. Szczegółowy wykaz tych organizmów zamieszczono w tabeli 4.4. Ponadto wykonano 2 testy toksyczności w środowisku glebowym z zastosowaniem 2 bioindykatorów, będących przedstawicielami roślin lądowych: *Sinapis alba* (gorczyca biała) i *Hordeum sativum* (jęczmień uprawny).

Tabela 4.4

Rodzaje wykonanych testów toksykologicznych

Poziom troficzny	Organizm testowy	Czas [h]	Kryterium oceny toksyczności
Destruenci	*Vibrio fischeri*	15 min[1]	bioluminescencja
Konsumenci	*Daphnia magna* *Lebistes reticulatus*	48 96	przeżywalność przeżywalność
Producenci	*Scenedesmus quadricauda* *Selenastrum capricornutum*	72 72	wzrost wzrost

[1] - test Microtox

Wyznaczone wartości IC_{50} dla glonów, LC_{50} dla gupika oraz EC_{50} dla rozwielitki pozwalają na klasyfikację substancji chemicznych pod względem szkodliwości dla organizmów wodnych, według Dyrektywy Unii Europejskiej [36] (tab.4.5).

Tabela 4.5

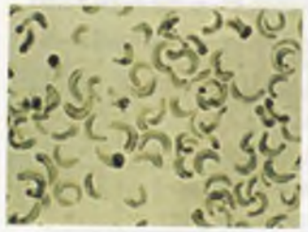
Klasyfikacja substancji chemicznych [36]

Klasa toksyczności		Ryby LC_{50}/96 h (mg/l)	Rozwielitka EC_{50}/48 h (mg/l)	Glony IC_{50}/72 h (mg/l)
R 50	silnie toksyczne	≤1	≤ 1	≤ 1
R 51	toksyczne	1-10	1-10	1-10
R 52	szkodliwe	>10 - 100	>10 - 100	>10 - 100

Organizmy użyte w badaniach zostały tak dobrane, aby charakteryzowały się jak największą ilością poniżej wymienionych cech:

- Były łatwe do hodowli w warunkach laboratoryjnych,
- Dawały szybką odpowiedź testową,
- Były łatwo dostępne,
- Miały małe wymiary,
- Stanowiły elementy łańcucha pokarmowego.

➢ ***Scenedesmus quadricauda*** – zielenica tworząca charakterystyczne, prosto zbudowane kolonie składające się z czterech lub ośmiu komórek zrośniętych bokami w jednej płaszczyźnie. Jej ściana komórkowa od strony zewnętrznej jest pektynowa, od strony wewnętrznej zbudowana jest z celulozy. Glon ten rozmnaża się tylko za pomocą autospor, tworzących się wskutek wielokrotnego podziału protoplastu wewnątrz komórki macierzystej. Nowe kolonie powstają poprzez łączenie się ze sobą autospor, które z chwilą opuszczenia komórki macierzystej układają się natychmiast w charakterystyczną kolonię. *Scenedesmus quadricauda* odgrywa ważną rolę w biocenozach wodnych jako producent stanowiący pokarm dla zooplanktonu. Jest powszechnie spotykany w zbiornikach wodnych Polski, gdzie często tworzy zakwity [114,195]. Hodowla użyta do testów została zapoczątkowana z kultury uzyskanej z IPO w Pszczynie.



➢ ***Selenastrum capricornutum*** *(Raphidocelis subcapitata)* Printz - zielenica, której komórki są skręcone śrubowato o zaostrzonych końcach; wielkości 1-3 x 4-6 μm; otoczona celulozową błoną komórkową. Rozmnażają się przez autospory. W ciągu 24 h powstaje 4-8 komórek potomnych. Glony te występują w zeutrofizowanych

wodach słodkich jako składnik planktonu [138]. Badania prowadzono na kulturze A TCC 22662, uzyskanej z Laboratorium for Biological Research in Aquatic Pollution, University of Ghent, Belgia.

➢ ***Daphnia magana,*** Straus - skorupiak planktonowy. W naturze zamieszkuje wody stojące. Ciało osiąga długość 2,2–6 mm, jest niewyraźnie podzielone na głowę, tułów i odwłok, otoczone przeźroczystym, dwuklapowym pancerzykiem nie przykrywającym głowy. Druga para czułków, silnie rozwinięta, jest głównym narządem ruchu. Odnóża tułowiowe poprzez swój intensywny ruch przyczyniają się do wymiany gazowej i do stałej filtracji pokarmu (fitoplanktonu). Oddycha całą powierzchnią ciała. Średni okres życia rozwielitki wynosi ok. 40 dni. Samice dojrzewają płciowo w 11-12 dni. Charakteryzują się partenogenetycznym sposobem rozmnażania. Mają duże znaczenie dla biocenozy wodnej, gdyż z jednej strony wpływają na zagęszczenie i skład gatunkowy planktonu roślinnego, a z drugiej same stanowią pokarm dla licznych ryb [208,216]. Organizmy użyte do testów pochodziły z IPO w Pszczynie.

➢ ***Lebistes reticulatus*** Peters – ryba żyworodna, długość do 6 cm, ciepłolubna. Gatunek pochodzi ze słodkich i słonawych wód Wenezueli i Trynidadu, jest często hodowany w akwariach ze względu na łatwość rozmnażania i hodowli. Żywi się między innymi larwami komarów i rozwielitkami [215]. Organizmy użyte w testach pochodziły z własnej hodowli laboratoryjnej. Były to osobniki młodociane o wymiarach 1-1,5 cm.

➢ ***Vibrio fischeri*** *(Photobacterium phosphoreum)* – są to przecinkowce polarnie urzęsione, Gram ujemne, względnie tlenowe. W normalnych warunkach 10% swojego metabolizmu przeznaczają na świecenie (luminescencję). Świecenie u tych organizmów zachodzi wskutek reakcji enzymu lucyferazy i alifatycznego aldehydu do nietrwałego kompleksu, który po rozpadzie emituje fotony [138].

➢ ***Sinapis alba*** *(gorczyca biała)* – roślina jednoroczna z rodziny krzyżowych, o łodydze wysokości 30-120 cm, szorstko owłosionej i silnie rozgałęzionej, liście pierzastodzielne, wierzchem ciemnozielone, spodem jaśniejsze. Kwiaty żółte, nasiona jasnożółte, okrągłe, o średnicy ok. 2 mm, zawierające ok.60% tłuszczu oraz olejki eteryczne [62]. Nasiona do testów pochodziły z placówki nasiennej.

➢ ***Hordeum sativum*** *(jęczmień uprawny)* roślina zaliczana do rodziny traw. Ziarno zawiera ok.14% wody, ok.11% białka, ok.65% skrobi, 2-4% tłuszczu, ok.2,5% związków mineralnych. Ziarna pochodziły z gospodarstwa rolnego.

4.2.1. Badanie zahamowania wzrostu glonów *Scenedesmus quadricauda* i *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*)

Badania prowadzono zgodnie z metodyką ujętą w Wytycznej OECD 201 [166] w ciągu 72 godzin w temperaturze 25 $\pm$ 2^{0}C przy stałym natężeniu światła 7000 lux. Glony - początkowe stężenie 1$\cdot$ 10^4 cenobii / cm^3 - były eksponowane na wzrastające stężenia badanych preparatów w roztworach wodnych. Doświadczenia wykonywano w seriach testowych, z których każda składała się z szeregu rozcieńczeń badanych substancji o wzrastających stężeniach przy współczynniku 1,5. Dla każdego stężenia preparatu wykonano cztery powtórzenia, zaś próbę kontrolną wykonano w sześciu powtórzeniach. Za miarę toksycznego działania preparatów na glony przyjęto stężenia powodujące 50% zahamowanie ich wzrostu IC_{50}.

Badania toksyczności roztworów pobiodegradacyjnych dla glonów prowadzono przez 72 godziny, przyjmując jako kryterium oceny inhibicje wzrostu osobników w odpowiednich roztworach.

4.2.2. Badania toksyczności ostrej preparatów na rybach *Lebistes reticulatus*

Doświadczenia prowadzono zgodnie z metodyką ujętą w Wytycznej OECD 203 [166]. Wykorzystywano wodę standaryzowaną, o pH 7,3 $\pm$ 0,2 i twardości ogólnej 152 mg $CaCO_3$ /dm^3. Badania prowadzono w temperaturze 22 $\pm$ 1^0 C w naczyniach o pojemności 250 ml. Przygotowano szereg rozcieńczeń złożony z minimum pięciu stężeń. Każde stężenie badano w czterech powtórzeniach, po 7 ÷ 8 osobników. Testy trwały 96 godzin, przy czym obserwacje objawów intoksykacji i śmiertelności prowadzono co 24 godziny. Za martwe uznawano ryby nie wykazujące żadnych ruchów (również skrzeli) i nie reagujące na bodźce zewnętrzne. Ponadto notowano również inne efekty, takie jak: zaburzenia lokomotoryczne, statyki, zaczerwienienie skrzel, i inne różniące się względem kontroli. Na podstawie obserwacji wyznaczono wartość końcową, to jest - LC_{50}/96 godzinach (mg/l) - stężenie powodujące 50% śmiertelność badanej populacji po 96 godzinach czasie ekspozycji organizmów testowych w roztworach substancji. Jako kryterium ważności badania stosowano śmiertelność nieprzekraczającą 10% w kontroli po 96 godzinach ekspozycji lub dopuszczano nie więcej niż jedną martwą rybę.

Badania toksyczności roztworów pobiodegradacyjnych w stosunku do gupika prowadzono przez 96 godzin, przyjmując jako kryterium oceny śmiertelność osobników w odpowiednich roztworach. W badaniach na gupiku stosowano po 5 osobników w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki.

4.2.3. Badania toksyczności ostrej preparatów na rozwielitce *Daphnia magna*

Doświadczenia prowadzono zgodnie z metodyką ujętą w Wytycznej OECD 202 [166]. Wykorzystywano wodę standaryzowaną, o pH 7,3 $\pm$ 0,2 i twardości ogólnej 152 mg $CaCO_3$ /dm^3.

Badania prowadzono w temperaturze 20 $\pm$ 1^0 C w naczyniach o pojemności 100 ml. Przygotowano szereg rozcieńczeń złożony z minimum pięciu stężeń. Każde stężenie badano w czterech powtórzeniach, po 5 osobników w powtórzeniu. Testy trwały 48 godzin, przy czym obserwacje objawów intoksykacji i śmiertelności prowadzono co 24 godziny. Za miarę toksycznego działania substancji przyjmuje się stężenie powodujące 50% unieruchomienie organizmów testowych (EC_{50}) po 48 godzinach ekspozycji w roztworach substancji.

Badania toksyczności dla organizmów wodnych dla każdej próbki powtarzano czterokrotnie celem wyliczenia odchylenia standardowego dla średniej z uzyskanych wartości $LC(IC,EC)_{50}$ i współczynników zmienności. Wartości $LC(IC,EC)_{50}$ obliczano

metodą logarytmiczno-probitową, przy poziomie istotności α =0,05 z wykorzystaniem programu komputerowego.

Badania toksyczności roztworów pobiodegradacyjnych w stosunku do rozwielitki prowadzono przez 48 godzin, przyjmując jako kryterium oceny unieruchomienie osobników w odpowiednich roztworach. W badaniach na rozwielitce stosowano po 10 osobników w 3 powtórzeniach dla każdej próbki.

4.2.4. Ocena toksyczności z zastosowaniem bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri*

Test był wykonywany przy użyciu analizatora Microtox M500, będącego bardzo czułym fotometrem zintegrowanym z inkubatorem zapewniającym stałe warunki testu (temp.15^{0}C) zgodnie z instrukcją producenta [150]. Przygotowano szereg rozcieńczeń badanej substancji, następnie dodawano zawiesinę zrehydratowanych bakterii *Vibrio fischeri*. Po 15 minutach inkubacji mierzono luminescencję próbek. Wyniki opracowano za pomocą komputerowego programu: Microtox 7.0 i podawano jako EC_{50} – stężenie próby powodujące obniżenie luminescencji o 50% [156] .

4.2.5. Test toksyczności z zastosowaniem roślin lądowych: *Sinapis alba* i *Hordeum sativum*

Badania prowadzono zgodnie z Polską Normą [194] w wazonach cylindrycznych z perforowanym dnem o średnicy 8 cm i wysokości 11cm, przy użyciu nie zaprawionych ziaren *Sinapis alba* i *Hordeum sativum*. Jako podłoża użyto piasku ze względu na jego małą pojemność sorpcyjną. Objętościowa pojemność wodna wykorzystywanego podłoża, wyznaczona przy użyciu wagosuszarki, wynosiła 17,34%. Piasek suszono w temperaturze 60 ± 5^0 C, a następnie napełniano nim wazony do wysokości około 9 cm. W każdym wazonie znajdowało się około 0,5 kg piasku. Glebę skażano badanymi związkami w ilości 1 mg/kg, 3 mg/kg, 9 mg/kg, 27 mg/kg, 81 mg/kg, 243 mg/kg, 729 mg/kg i 2187 mg/kg suchej masy gleby. Roztwory substancji badanych wprowadzano w ilości 60 cm^3 do wazonu, co stanowiło 70% wyznaczonej objętościowej pojemności wodnej. Taka ilość płynu zapewniała jego równomierne rozprowadzenie w przyjętej objętości piasku i zapobiegała stratom poprzez wyciekanie. W każdym wazonie sadzono 5 skiełkowanych ziaren gorczycy lub jęczmienia, o korzonkach długości od 2 do 5 mm i umieszczano je na głębokości 10 mm.

Nasiona podkiełkowywano na płytkach Petriego, w termostacie, w temperaturze 20^{0}C przez 48 godzin. Następnie wazony włożono do fitotronu (fot. 4.1), gdzie

inkubowano je przez 96 godzin. Dzień trwał 10 godzin, natomiast noc 14 godzin. Temperatura dzienna wynosiła 23 ± 1°C; nocna 20 ± 1°C. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach, równolegle obsadzając trzy wazony kontrolne, do których wprowadzono wodę destylowaną.

Po określonym czasie wzrostu mierzono długość korzenia i łodygi. Za miarę toksycznego działania preparatów na rośliny przyjęto stężenie powodujące 50% zahamowanie wzrostu korzenia i łodygi w porównaniu z próbą kontrolną.

Fot. 4.1. Stanowisko do badania toksyczności na roślinach wyższych
Phot. 4.1. Research post for testing toxicity with plants

4.3. Test genotoksyczności na zdolność do naprawy DNA u *Bacillus subtilis*

W badaniach oceniających genotoksyczność preparatów zastosowano test bakteryjny opracowany przez Kada [109]. Stosowano szczep *Bacillus subtilis* M45 Rec$^-$, który wykazuje brak zdolności do reparacji DNA i szczep H17 Rec$^+$ mający tę zdolność. Test polegał na posiewie smugą, na tej samej płytce Petriego z agarem, obu szczepów, ze wspólnego punktu i umieszczeniu w tymże punkcie bibułowego krążka nasączonego roztworem badanej substancji (rys.4.4). Dla każdego preparatu prowadzono 3 równoległe serie testowe, z których każda składała się z szeregu stężeń. Płytki inkubowano przez 24 godz. w temperaturze 4^0 C, a następnie przez taki sam okres czasu w temperaturze 37^0 C. Po tym czasie mierzono strefy zahamowania wzrostu obu szczepów, obliczano różnicę między wielkością strefy zahamowania wzrostu szczepu M45 Rec$^-$ a H17 Rec$^+$. Jeżeli strefa zahamowania wzrostu szczepu M45 Rec$^-$, będąca

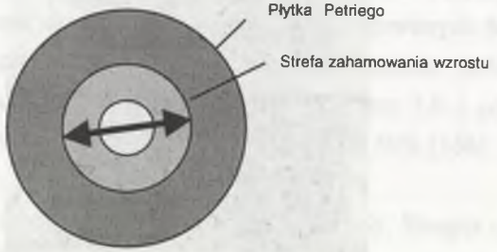
wynikiem zadziałania badanej substancji, była odpowiednio większa niż w przypadku szczepu H17 Rec^+, przyjęto że badany związek uszkadza DNA, a tym samym ma właściwości mutagenne.

Badania genotoksyczności produktów po biodegradacji prowadzono w trzech seriach testowych, zanurzając bibułowy krążek w badanych roztworach wodnych.

Przy podawaniu wyników przyjęto następujący system oznaczeń:

- (-) brak właściwości mutagennych, różnica stref zahamowania wzrostu $\leq$ 2 mm,
- (±) związek potencjalnie mutagenny, różnica stref zahamowania wzrostu > 2 mm i $\leq$ 4 mm,
- (+) związek mutagenny, różnica stref zahamowania wzrostu > 4 mm i $\leq$ 6 mm.

Szczepy pochodziły z Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Śląskiego.



Rys. 4.4. Schemat posiewu w teście Rec przy użyciu *Bacillus subtilis*
Fig. 4.4. Scheme of proceeding in rec-assay with *Bacillus subtilis*

4.4. Metodyka badań biodegradacji czwartorzędowych chlorków z podstawnikiem alkoksymetylowym lub alkilotiometylowym testem rzecznym

Badania prowadzono w zbiornikach o pojemności 40 dm^3 według zmodyfikowanego testu rzecznego [217,220]. Modyfikacja polegała na zastąpieniu wody rzecznej, ze względu na duży stopień zanieczyszczenia wód powierzchniowych na Śląsku, odchlorowaną wodą wodociągową. Do napowietrzanych zbiorników (fot. 4.2) wprowadzono zaszczep mikroorganizmów osadu czynnego w ilości 1 ml/dm^3 (uprzednio adaptowanych do utlenienia badanych związków w doświadczalnej komorze napowietrzania), sole pożywkowe (przygotowane zgodnie z wytycznymi OECD [166]) oraz badane preparaty, stanowiące jedyne źródło węgla i energii w takiej ilości, aby uzyskać stężenie 1,0 mg/dm^3. Wartość ta wynikała z następujących przesłanek:

- ✓ Badane preparaty okazały się toksyczne dla mikloflory rzecznej $EC(IC)_{50}$< 1 mg/dm^3. W związku z tym stosowanie wyższych stężeń było nieuzasadnione.
- ✓ Stężenie CSA pojawiające się w wodach powierzchniowych zawarte jest w granicach 0,7-92 $\mu g/dm^3$ [59,131,199,254].
- ✓ Granica oznaczalności CSA wynosiła 0,005 mg/dm^3, a zatem stosowanie stężeń znacznie niższych niż 1 mg/dm^3 mogło spowodować ograniczenie oznaczenia ich pozostałości w próbach po degradacji (zakładano wysoki stopień degradacji badanych związków).
- ✓ Produkty biodegradacji nie powinny być zbyt silnie rozcieńczane do późniejszych testów toksykologicznych.
- ✓ Badania nad degradacją CSA prowadzone w innych ośrodkach [220] wykazały, że w przypadku testu rzecznego zaleca się stosowanie stężeń detergentów z zakresu 1 – 10 ppm, jako dających wiarygodną odpowiedź testową.

Fot. 4.2. Stanowisko do badania biodegradacji w teście „rzecznym"
Phot. 4.2. Research post for testing biodegradation in "river-water" test

Do oceny procesu biodegradacji, oprócz standardowych oznaczeń analitycznych rozpuszczonego węgla organicznego (RWO) za pomocą aparatu firmy Beckman Industrial Model 915 B Tocamaster dla próbek sączonych, stężenia substancji powierzchniowo czynnej metodą kolorymetryczną z błękitem disulfinowym [170,255], wykonano widma spektroskopowe związków oraz ich roztworów pobiodegradacyj-

nych. Położenie sygnałów w widmie NMR jest ściśle zależne od budowy cząsteczki substancji. Analiza widm umożliwiła śledzenie mechanizmu rozkładu badanych substancji na poziomie cząsteczki ZPC i wyjaśniła wiele kwestii, w tym ocenę biodegradacji po zamianie jednego łańcucha hydrofobowego grupą benzylową lub pierścieniem cyklicznym. Dodatkowo kontrolowano zawartość O_2 (sondą tlenową) i pH (potencjometrycznie).

4.4.1. Analiza widmowa ^{1}H NMR i ^{13}C NMR

Objętości prób pobieranych do analizy wynosiły 10,0 dm^3. W pierwszej kolejności próby poddawano trzykrotnej ekstrakcji chloroformowej, po czym uzyskany ekstrakt zatężano pod próżnią do suchej pozostałości. Ekstrakty przeznaczone do analizy widmowej ^{1}H NMR i ^{13}C NMR zatężano dwustopniowo, stosując kolejno kolby o pojemności 1000 i 25 cm^3. Następnie suchą pozostałość roztwarzano w deuterowanym chloroformie. Wymieniony rozpuszczalnik zapewniał dobrą rozpuszczalność badanych substancji powierzchniowo czynnych. Widma wyznaczano przy użyciu spektrometru typu VXR Varian o częstotliwości 300MHz dla ^{1}H NMR i 75 MHz dla ^{13}C NMR. Pomiarów dokonywano w temperaturze 20°C wobec wewnętrznego wzorca TMS (tetrametylosilanu). Interpretację widm prowadzono zgodnie z zaleceniami literatury [147,228,277].

5. ANALIZA, INTERPRETACJA I DYSKUSJA WYNIKÓW

5.1. Toksyczność czwartorzędowych chlorków amoniowych

W badaniach nad wpływem nowych czwartorzędowych chlorków amoniowych o bliżej nieznanych właściwościach toksykologicznych w stosunku do środowiska wodnego użyto organizmów testowych reprezentujących różne poziomy troficzne zbiornika wodnego. Jako bioindykatory zastosowano: glony *Scenedesmus quardicauda* i *Selenastrum capricornutum*, stanowiące pierwsze ogniwo w łańcuchu pokarmowym (producenci), skorupiaki *Dapnia magna* Straus (konsumenci I rzędu - w łańcuchu pokarmowym, organizm planktonowy), ryby *Lebistes reticulatus*, reprezentujące najwyższy poziom troficzny w środowisku wodnym (konsumenci II rzędu) oraz przedstawiciele destruentów bakterie *Vibrio fischeri*. Dobór organizmów wynikał z roli, jaką pełnią w łańcuchu pokarmowym, oraz że są najczęściej stosowanymi biowskaźnikami dla substancji powierzchniowo czynnych [55,56,59,132,192,209,243]. Do badań włączono przedstawicieli roślinności glebowej ze względu na możliwość przedostawania się tych preparatów do gleby po zastosowaniu w budownictwie, rolnictwie, jako środki grzybobójcze [48,50] i owadobójcze [123]. Zastosowane rośliny są przedstawicielami roślin jednoliściennych (*Hordeum sativum*) i dwuliściennych (*Sinapis alba*), zalecanymi do badań przez Wytyczne OECD [166].

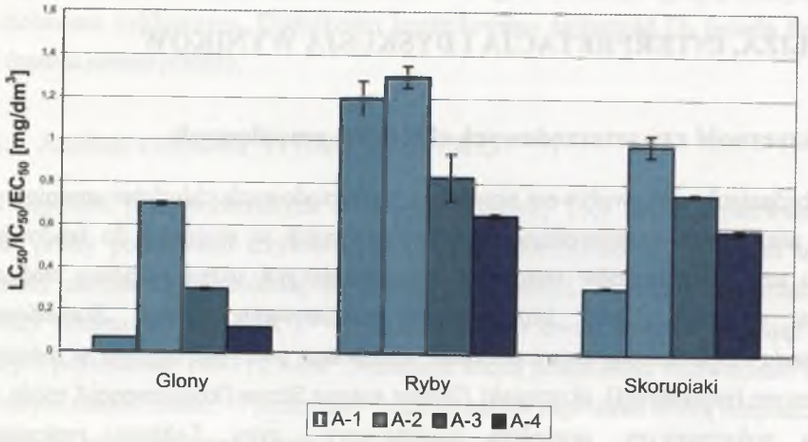
5.1.1. Badanie toksyczności na organizmach wodnych

Uzyskane wyniki badań toksyczności wybranych czwartorzędowych soli amoniowych w stosunku do glonów *Scenedesmus quadricauda*, ryb *Lebistes reticulatus* i skorupiaków *Dapnia magna* przedstawiono na rys. 5.1- 5.3.

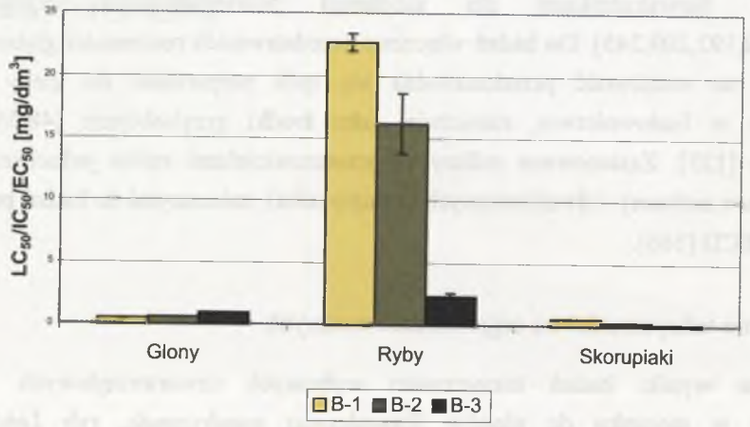
Badane związki wykazują zróżnicowanie w działaniu toksycznym na organizmy.

Najniższe działanie toksyczne chlorki (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowe przejawiały w stosunku do ryb. Substancje oznaczone symbolem A-1, A-2 wykazały zbliżoną toksyczność ostrą do gupika, gdyż wartość średnich stężeń powodujących 50-procentową śmiertelność ryb (LC_{50}) po 96 godz. ekspozycji wynosiła 1,2 ±

0,08 mg/dm^3 i 1,3 ± 0,05 mg/dm^3, dla A-3 wskazywała wartość 0,83±0,07 mg/dm^3, a dla preparatu A-4, który okazał się najbardziej toksyczny, 0,65±0,01 mg/dm^3 (rys.5.1).



Rys. 5.1. Toksyczność chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych w stosunku do organizmów wodnych
Fig. 5.1. Toxicity of (alkoxymethylalkyldimethylammonium chlorides to water organisms



Rys. 5.2. Toksyczność chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych w stosunku do organizmów wodnych
Fig. 5.2. Toxicity of benzyl(alkoxymethyl)dimethylammonium chlorides to water organisms

Przeprowadzone badania toksyczności na skorupiaku *Dapnia magna* wykazały, że badane związki charakteryzowały się wyższą toksycznością w stosunku do rozwielitki aniżeli do ryb, bowiem stężenia letalne dla tego skorupiaka mieściły się w przedziale

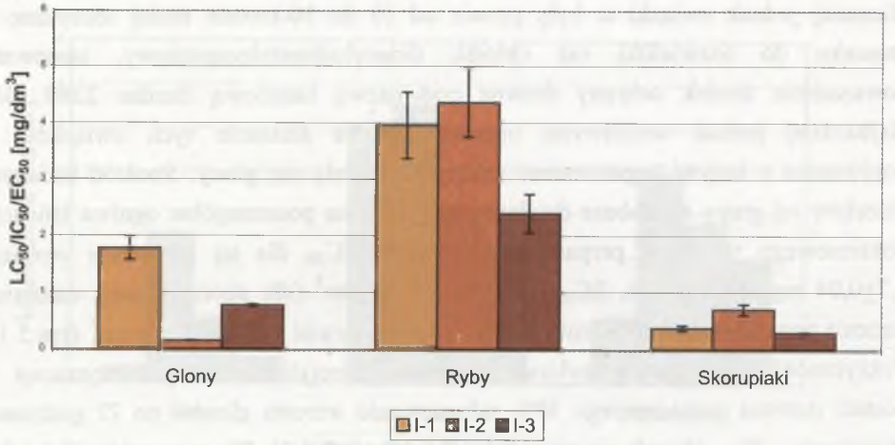
0,31-0,98 mg/dm^3, a dla ryb 0,65-1,3 mg/dm^3. Wyniki te potwierdzają dane literaturowe [46,118,243], w których również wykazano wyższą wrażliwość *Dapnia magna* niż ryb na działanie kationowych związków powierzchniowo czynnych. Niemniej jednak związki te były prawie od 10 do 30-krotnie mniej toksyczne w stosunku do rozwielitki niż chlorek didecylodimetyloamoniowy, stosowany powszechnie środek ochrony drewna pod nazwą handlową Bardac 2280 [43]. Najbardziej jednak wrażliwymi organizmami na działanie tych związków w porównaniu z innymi organizmami wodnymi okazały się glony. Spośród badanych chlorków tej grupy najsłabsze działanie toksyczne na poszczególne ogniwa łańcucha pokarmowego wywierał preparat A-2. Wartość IC_{50} dla tej substancji wynosiła 0,7±0,04 mg/dm^3 (glony), EC_{50} - 0,98±0,05 mg/dm^3 (dla skorupiaków), natomiast stężenie powodujące śmiertelność 50% ryb miało wartość 1,3± 0,05 mg/dm^3 (rys.5.1). Toksyczność chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych wyrażona w postaci stężenia powodującego 50% zahamowanie wzrostu glonów po 72 godzinach ekspozycji - IC_{50} okazała się mało zróżnicowana (rys.5.2). Dla preparatów B-1 i B-2 wynosiła 0,5± 0,04 i 0,59± 0,03 mg/dm^3. Najniższą toksycznością charakteryzował się związek B-3. Wartość IC_{50} dla tej substancji wyniosła 0,95±0,05 mg/dm^3.

Natomiast wyniki toksyczności ostrej związków dla ryb *Lebistes reticulatus* wykazały duże zróżnicowanie. Najniższą toksycznością cechował się preparat oznaczony symbolem B-1, którego LC_{50} wyniosło 22,7± 2,1 mg/dm^3. Wartość LC_{50} dla substancji B-3 była wielokrotnie niższa i wyniosła 2,3±0,16 mg/dm^3.

Również i dla tych związków stwierdzono znacznie większą toksyczność w stosunku do rozwielitki niż do ryb, gdyż letalne stężenia dla *Dapnia magna* mieściły się w przedziale 0,16-0,58mg/dm^3. Zauważono, że toksyczność tych substancji w stosunku do ryb i rozwielitki wzrastała wraz z długością łańcucha hydrofobowego. Podobne zależności wykazano dla bromków i chlorków alkilometyloamoniowych w badaniach na *Daphnia magna* i *Photobacterium phosphoreum* (*Vibrio fischeri*) [54,56]. Uzyskane wyniki badań toksyczności chlorków 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych w stosunku do glonów *Scenedesmus quadricauda*, ryb *Lebistes reticulatus* oraz skorupiaków *Dapnia magna* przedstawia rysunek 5.3. Stwierdzono, że najsłabsze działanie tych preparatów, jak i poprzednich, było w stosunku do ryb.

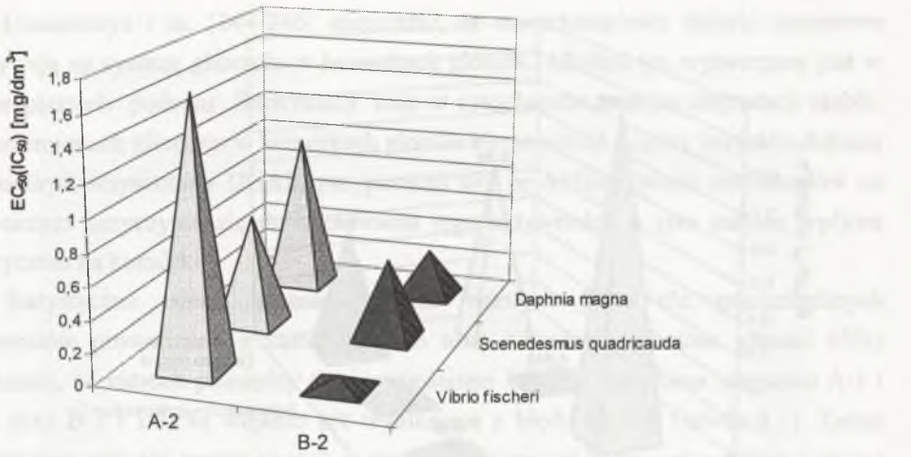
Niemniej jednak wprowadzenie atomu siarki w miejsce tlenu w podstawniku alkilowym powodowało wzrost toksyczności związku. Wartość LC_{50} obniżyła się z wartości 3,96± 0,29 mg/dm^3 dla chlorku I-1 do wartości 2,4± 0,15mg/dm^3 w przypadku chlorku I-3. Podobną zależność obserwowano dla tych związków w przypadku ich oddziaływania na glony. Wartość IC_{50} malała z 1,78± 0,15 mg/dm^3 dla

chlorku I-1 do 0,77± 0,02 mg/dm^3 dla preparatu I-3. Potwierdza to wyniki wcześniejszych badań prowadzonych dla podobnych chlorków [67,71-74,80].



Rys. 5.3. Toksyczność badanych chlorków imidazoliowych w stosunku do organizmów wodnych
Fig. 5.3. Toxicity of study limidazolium chlorides to water organisms

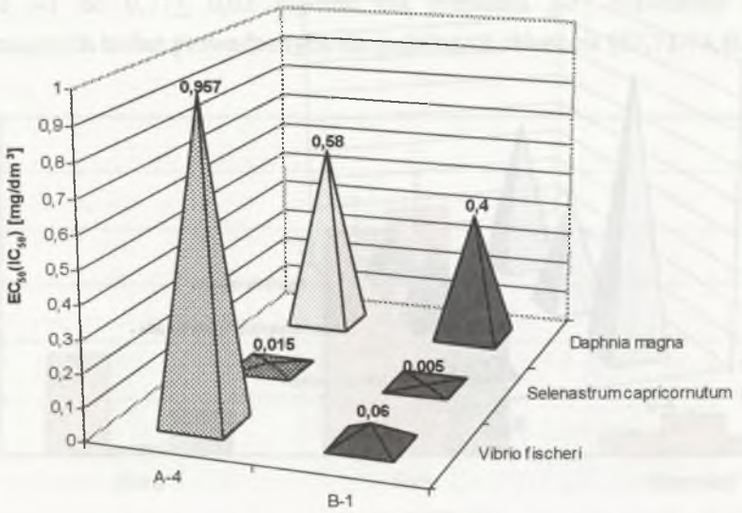
Zastąpienie jednego łańcucha alkilowego grupą benzylową powodowało kilku- do kilkunastokrotny wzrost toksyczności związku w zależności od badanego organizmu (rys.5.4-5.5). Być może przyczyną tego zjawiska jest obecność w cząsteczce benzenu wiązania nienasyconego, które nie tylko wpływa na zwiększenie reaktywności chemicznej i hydrofilności związku, lecz przede wszystkim na zwiększenie jego toksyczności w organizmach żywych. Wiązania nienasycone charakteryzuje bowiem duży potencjał oksydacyjny, który w organizmie żywym wywiera niekorzystne działanie, związane z utlenieniem ważnych funkcyjnie grup sulfhydrylowych (SH), występujących w zredukowanym glutationie, cysteinie, metioninie. Sánchez [209], obserwując podobne zależności w badaniach na *Daphnia magna* i *Photobacterium phosphoreum* (*Vibrio fischeri*), wiąże to z faktem, że bromki i chlorki alkilodimetyloamoniowe, posiadając większą drobinę niż ich odpowiedniki z podstawnikiem benzylowym, są słabiej rozpuszczalne w wodzie i przez to mniej dostępne dla komórek bakteryjnych.



Rys. 5.4. Wpływ podstawnika benzylowego na toksyczność wobec wybranych organizmów wodnych
Fig. 5.4. Influence of benzyl substitute on toxicity to selected water organisms

Badania wykazały, że w stosunku do wszystkich przebadanych związków wyższą wrażliwością cechowała się *Dapnia magna* niż ryby *Lebistes reticulatus*. Jest to zgodne z danymi literaturowymi w stosunku do czwartorzędowych soli amoniowych [9,46,75,243], choć w przypadku innej grupy preparatów, na przykład pestycydów, wyższą wrażliwość wykazywały ryby [243]. Jednakże uzyskane wartości EC_{50} dla badanych związków były prawie 50-krotnie niższe niż podane dla tego gatunku w wyniku działania kationowych surfaktantów używanych przez firmę Lonza z USA w środkach ochrony drewna [43], a porównywalne z rezultatami przedstawionymi przez Garcię i in. [56] oraz Kümmurera i in. [127].

Jednocześnie w badaniach długoterminowych *Dapnia magna* wykazała zdolność do szybkiego przystosowania się do warunków środowiska, w następstwie czego ich wrażliwość na działanie z CSA malała z upływem czasu [9]. Mniejszą jednak wrażliwość na działanie badanych CSA wykazywał inny skorupiak *Artemia salina* [156], którego toksyczność była podobna do rezultatów uzyskanych przez Pantaniego i in. [173] w badaniach na *Echinogammarus tibaldii*. Najbardziej jednak wrażliwymi organizmami na działanie tych związków w porównaniu z innymi organizmami wodnymi okazały się glony, co wykazano już wcześniej [99], lecz i w tej grupie organizmów zauważono dużą zmienność między poszczególnymi gatunkami.



Rys. 5.5. Wpływ podstawnika benzylowego na toksyczność wobec wybranych organizmów wodnych
Fig. 5.5. Influence of benzyl substitute on toxicity to selected water organisms

Uzyskane wartości IC_{50} dla *Selenastrum capricornutum* były od 10- do 100-krotnie niższe od wartości otrzymanych dla *Scenedesmus quadricauda* (tabela 5.6a-e). Sugeruje to, że różnice w oddziaływaniu badanych związków na glony mogą wynikać z różnej budowy ściany komórkowej w zależności od gatunku glonów [162]. Obserwowane zmiany w budowie *Selenastrum capricornutum* w wyniku działania na komórki badanych czwartorzędowych soli amoniowych przedstawia fot. 5.1.

A B

Fot. 5.1. Komputerowy obraz *Selenastrum capricornutum* w powiększeniu 1000-krotnym: A - bez wpływu działania CSA, B - pod wpływem działania CSA
Phot. 5.1. Microscope picture of Selenastrum capricornutum under 1000x magnification: A - without QAS, B - with QAS

Utsunomiya i in. [244-246] stwierdzili, że czwartorzędowe chlorki amoniowe wpływają na syntezę glicerolu w komórkach glonów. Alkohol ten wytwarzany jest w chloroplastach podczas fotosyntezy oraz w cytoplazmie podczas degradacji skrobi. W przemianach glicerolu w komórkach glonów bierze udział między innymi reduktaza fosfodihydroksyacetonu DHAP; przypuszcza się, że oddziaływanie surfaktantów na ten enzym przyczynia się do hamowania jego aktywności, a tym samym wpływa toksycznie na komórki.

Statystyczna ocena istotności różnic wartości LC_{50} dla poszczególnych preparatów prowadzona z zastosowaniem testu t-Studenta (poziom ufności 95%) wykazała, że różnice pomiędzy tymi wartościami LC_{50} (z wyjątkiem preparatu A-1 i A-2 oraz B-3 i I-3) są większe niż wynikające z błędu analizy (tabela 5.1). Zatem przebadane związki można ułożyć w szereg toksyczności w stosunku do ryb *Lebistes reticulatus* jak niżej:

A-4 > A-3 > A-1 i A-2 > B-3 i I-3 > I-1 > I-2 > B-2 > B-1

Tabela 5.1

Wyniki testu t-Studenta dla pomiarów niesparowanych oceniające różnice pomiędzy wartościami LC_{50} uzyskanymi dla różnych preparatów w teście dla gupika

	A-1	A-2	A-3	A-4	B-1	B-2	B-3	I-1	I-2	I-3
A-1										
A-2	–									
A-3	+	+								
A-4	+	+	+							
B-1	+	+	+	+						
B-2	+	+	+	+	+					
B-3	+	+	+	+	+	+				
I-1	+	+	+	+	+	+	+			
I-2	+	+	+	+	+	+	+	+		
I-3	+	+	+	+	+	+	–	+	+	

„+" – różnice wartości LC_{50} istotne statystycznie na poziomie ufności 95%
„-" – różnice wartości LC_{50} nieistotne statystycznie na poziomie ufności 95%

Tabela 5.2

Wyniki testu t-Studenta dla pomiarów niesparowanych oceniające różnice pomiędzy wartościami EC_{50} uzyskanymi dla różnych preparatów w teście na rozwielitkach

	A – 1	A – 2	A – 3	A – 4	B – 1	B – 2	B – 3	I – 1	I – 2	I – 3
A – 1										
A – 2	+									
A – 3	+	+								
A – 4	+	+	+							
B – 1	+	+	+	–						
B – 2	–	+	+	+	+					
B – 3	+	+	+	+	+	+				
I – 1	+	+	+	+	+	+	+			
I – 2	+	+	–	+	+	+	+	+		
I – 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

„+" – różnice wartości EC_{50} istotne statystycznie na poziomie ufności 95%
„-" – różnice wartości EC_{50} nieistotne statystycznie na poziomie ufności 95%

Analiza testem t-Studenta [225] wykazała, że różnice pomiędzy wartościami EC_{50} są istotne statystycznie (dla $\alpha = 0,05$), z wyjątkiem różnic pomiędzy preparatami B-2 i A-1, B-1 i A-4 oraz A-3 i I-2 (tabela 5.2). Można zatem z 95% prawdopodobieństwem stwierdzić, iż szereg toksyczności w stosunku do skorupiaka *Dapnia magna* jest następujący:

B - 3 > A – 1 i I - 3 > B - 2 > I - 1 > B – 1 i A- 4 > A – 3 i I -2 > A – 2

Analiza statystyczna otrzymanych wyników dla glonów *Selenastrum capricornutum* pozwoliła na stwierdzenie, iż dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ istniały statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami IC_{50} badanych związków (z wyjątkiem preparatu B-1, B-2 i I-3 oraz B-3 i A-4) (tabela 5.3), co pozwoliło uszeregować przebadane preparaty według malejącej toksyczności:

B - 1, B – 2 i I - 3 > A -1 > B – 3 i A - 4 > I - 1 > I - 2 > A - 2 > A - 3

Tabela 5.3

Wyniki testu t-Studenta dla pomiarów niesparowanych oceniające różnice pomiędzy wartościami IC_{50} uzyskanymi dla różnych preparatów w teście dla glonów *Selenastrum capricornutum*.

	A – 1	A – 2	A – 3	A – 4	B – 1	B – 2	B – 3	I – 1	I – 2	I – 3
A – 1										
A – 2	+									
A – 3	+	+								
A – 4	+	+	+							
B – 1	+	+	+	+						
B – 2	+	+	+	+	+					
B – 3	+	+	+	–	+	+				
I – 1	+	+	+	+	+	+	+			
I – 2	+	+	–	+	+	+	+	+		
I – 3	+	+	+	+	–	–	+	+	+	

„+" – różnice wartości IC_{50} istotne statystycznie na poziomie ufności 95%
„-" – różnice wartości IC_{50} nieistotne statystycznie na poziomie ufności 95%

Tabela 5.4

Wyniki testu t-Studenta dla pomiarów niesparowanych oceniające różnice pomiędzy wartościami IC_{50} uzyskanymi dla różnych preparatów w teście dla glonów *Scenedesmus quadricauda*

	A – 1	A – 2	A – 3	A – 4	B – 1	B – 2	B – 3	I – 1	I – 2	I – 3
A – 1										
A – 2	+									
A – 3	+	+								
A – 4	+	+	+							
B – 1	+	+	+	+						
B – 2	+	+	+	+	–					
B – 3	+	+	+	+	+	+				
I – 1	+	+	+	+	+	+	+			
I – 2	+	+	+	–	+	+	+	+		
I – 3	+	–	+	+	+	+	+	+	+	

„+" – różnice wartości IC_{50} istotne statystycznie na poziomie ufności 95%
„-" – różnice wartości IC_{50} nieistotne statystycznie na poziomie ufności 95%

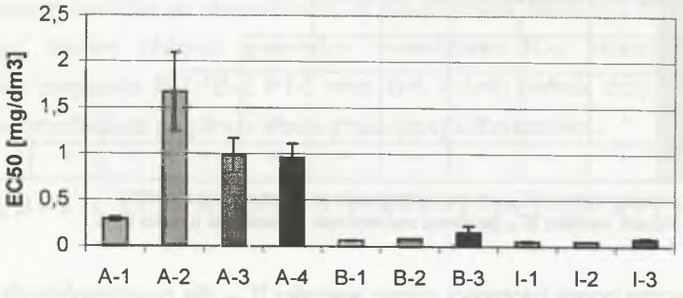
Statystyczna ocena istotności różnic wartości IC_{50} dla poszczególnych preparatów w teście dla glonów *Scenedesmus quadricauda* prowadzona z zastosowaniem testu t-Studenta (poziom ufności 95%) wykazała, że różnice pomiędzy tymi wartościami

IC_{50} (z wyjątkiem preparatu B-1 i B-2, A-2 i I-3 oraz I-2 i A-4) są większe niż wynikające z błędu analizy (tabela 5.4). Zatem przebadane związki można ułożyć w szereg toksyczności w stosunku do glonów *Scenedesmus quadricauda* jak niżej:

A-1 > A-4 i I-2 > A-3 > B-1 i B-2 > A-2 i I-3 > B-3 > I-3

Toksyczność badanych związków w stosunku do bakterii *Vibrio fischeri* przedstawiono na rysunku 5.6. Wartości EC_{50} wahają się od 0,05 ± 0,004 do 1,669 ± 0,427 mg/dm^3. Najmniejszą toksyczność wobec tych organizmów wykazują chlorki (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowe, a wśród nich preparat zawierający w łańcuchu hydrofobowym 12 węgli (A-2). Wartość EC_{50} tego związku wynosiło 1,699 ± 0,127 g/dm^3. Prawie dwudziestokrotnie wyższą toksycznością cechowały się chlorki benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowe i imidazoliowe. Być może przyczyną tego faktu jest obecność w tych grupach związków pierścieni aromatycznych. Sądzić tak można, gdyż dla chlorków alkilotiometylopirydyniowych uzyskiwano podobne wartości [156].

W przypadku chlorków imidazoliowych zastąpienie łańcucha hydrofobowego cykloheksanem lub zastąpienie atomu tlenu atomem siarki nie spowodowało zmiany właściwości toksycznych związku wobec bakterii *Vibrio fischeri*. Natomiast wzrost ilości węgli w łańcuchu w przypadku chlorków benzylo(alkoksymetylo) dimetyloamoniowych obniżał właściwości toksyczne preparatów, bowiem wartość EC_{50} dla preparatu posiadającego 8 węgli w rodniku B-1 wynosiła 0,06 ± 0,0046 mg/dm^3, natomiast dla preparatu B-3 posiadającego 12 węgli w łańcuchu alifatycznym 0,153 ± 0,01 mg/dm^3. Podobne rezultaty w teście Microtox uzyskał Kaiser i Palabrica [110] dla chlorku benzylodimetylododecyloamoniowego i cetylotrimetyloamoniowego.



Rys. 5.6. Toksyczność badanych chlorków amoniowych w stosunku do bakterii *Vibrio fischeri*
Fig. 5.6. Toxicity of ammonium chlorides to *Vibrio fischeri*

Wszystkie wskaźniki toksyczności cechowały się niskimi wartościami zmienności, mieszczącymi się w zakresie od 1,0 do 9,25 % (tabela 5.6a – 5.6e).

Analiza statystyczna otrzymanych wyników pozwoliła na stwierdzenie, iż dla poziomu istotności α=0,05 istniały statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami EC_{50} uzyskanymi dla chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych i benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych oraz imidazoliowych (tabela 5.5). Natomiast różnice pomiędzy wartościami EC_{50} w obrębie grupy chlorków 1 alkilo-3-metyloimidazoliowych należy uznać za wynikające z błędu analizy.

Tabela 5.5

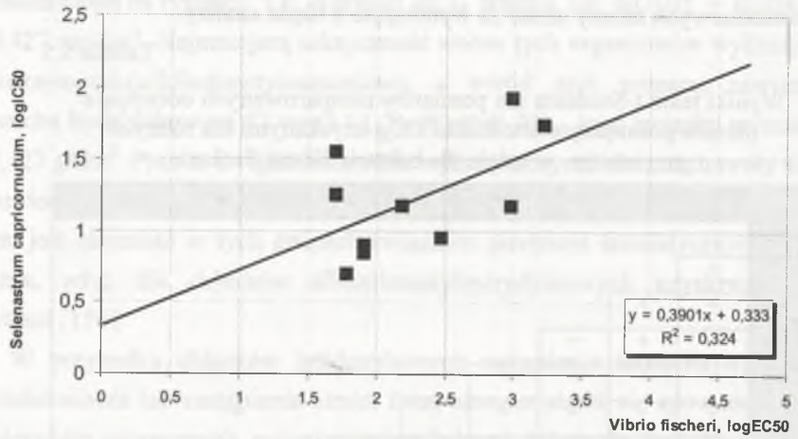
Wyniki testu t-Studenta dla pomiarów niesparowanych oceniające różnice pomiędzy wartościami EC_{50} uzyskanymi dla różnych preparatów w teście dla bakterii *Vibrio fischeri*

	A-1	A-2	A-3	A-4	B-1	B-2	B-3	I-1	I-2	I-3
A-1										
A-2	+									
A-3	+	+								
A-4	+	+	+							
B-1	+	+	+	+						
B-2	+	+	+	+	–					
B-3	+	+	+	+	+	+				
I-1	+	+	+	+	+	+	+			
I-2	+	+	+	+	+	+	+	–		
I-3	+	+	+	+	–	+	+	–	–	

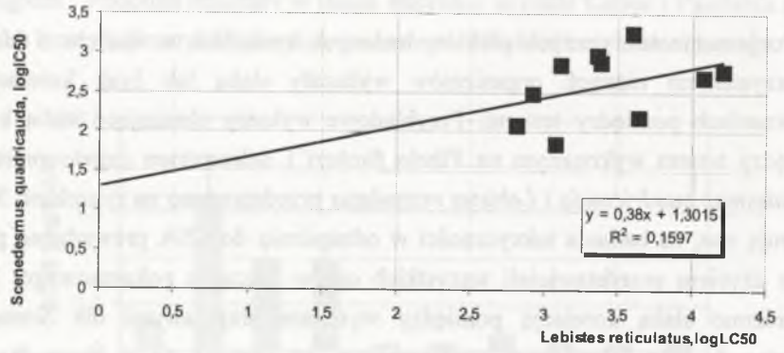
„+" – różnice wartości IC_{50} istotne statystycznie na poziomie ufności 95%
„-" – różnice wartości IC_{50} nieistotne statystycznie na poziomie ufności 95%

Porównanie toksycznych efektów badanych związków w oparciu o biotesty z wykorzystaniem różnych organizmów wykazały słabą lub brak korelacji przy porównaniach pomiędzy testami. Przykładowe wykresy obrazujące słabą korelację pomiędzy testem wykonanym na *Vibrio fischeri* i *Selenastrum capricornutum* oraz *Scenedesmus quadricauda* i *Lebistes reticulatus* przedstawiono na rysunkach 5.7 i 5.8. Sugerują one, że badania toksyczności w odniesieniu do CSA prowadzone powinny być z użyciem przedstawicieli wszystkich ogniw łańcucha pokarmowego. Ponadto stwierdzono słabą korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi dla *Scenedesmus quadricauda* oraz *Selenastrum capricornutum*, co oznacza, że w przypadku testów toksyczności wybór gatunku organizmu testowego wpływa na uzyskiwane wyniki i musi być uwzględniony przy ich interpretacji.

Tezę tę potwierdzają wyniki uzyskiwane przez innych badaczy. W badaniach prowadzonych przez Bluma i Speece'a uzyskano wysoką korelację pomiędzy testem na bakteriach (Microtox) a testem na *Pimephales promelas* i *Daphnia magna*, natomiast słabe korelacje z testami prowadzonymi na innych zwierzętach kręgowych i bezkręgowych [7].



Rys. 5.7. Porównanie efektów toksycznych badanych związków w oparciu o biotesty na glonach i bakteriach
Fig. 5.7. Comparison of toxic effects of preparations at the base of algae and bacteria biotests



Rys. 5.8. Porównanie efektów toksycznych badanych związków w oparciu o biotesty na glonach i rybach
Fig. 5.8. Comparison of toxic effects of preparations at the base of algae and fish biotests

Tabela 5.6a

Wartości uzyskane w testach toksyczności

Chlorki	Stosowane organizmy testowe					
A - 1	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,07	0,002	2,9	0,009	0,0008	8,8
	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,31	0,005	1,6	1,2	0,08	6,6
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,293		0,018		6,1	
A - 2	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,7	0,04	5,7	0,055	0,005	9,0
	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,98	0,05	5,1	1,3	0,05	3,9
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	1,669		0,127		7,6	

Tabela 5.6b

Wartości uzyskane w testach toksyczności

Chlorki	Stosowane organizmy testowe					
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
A - 3	0,3	0,02	6,6	0,085	0,005	5,8
	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,75	0,006	8,0	0,83	0,07	8,4
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,981		0,087		8,8	
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
A - 4	0,12	0,009	7,5	0,015	0,001	6,6
	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,58	0,01	1,7	0,65	0,01	1,5
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,957		0,09		9,4	

Tabela 5.6c

Wartości uzyskane w testach toksyczności

Chlorki	Stosowane organizmy testowe					
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
B - 1	0,5	0,04	8,0	0,005	0,0002	4,0
	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,58	0,05	8,6	22,7	2,1	9,25
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,06		0.0046		7,6	
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
B - 2	0,59	0,03	5,0	0,007	0,0005	7,1
	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,3	0,009	3,0	16,2	1,4	8,6
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,08		0,005		6,2	

Tabela 5.6d

Wartości uzyskane w testach toksyczności

Chlorki	Stosowane organizmy testowe					
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,95	0,05	5,2	0,015	0,001	6,6
B - 3	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,16	0,004	2,5	2,3	0,16	6,9
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,153		0,01		6,5	
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	1,78	0,15	8,4	0,018	0,001	5,5
I - 1	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,37	0,03	8,1	3,96	0,29	7,3
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,05		0,004		8,0	

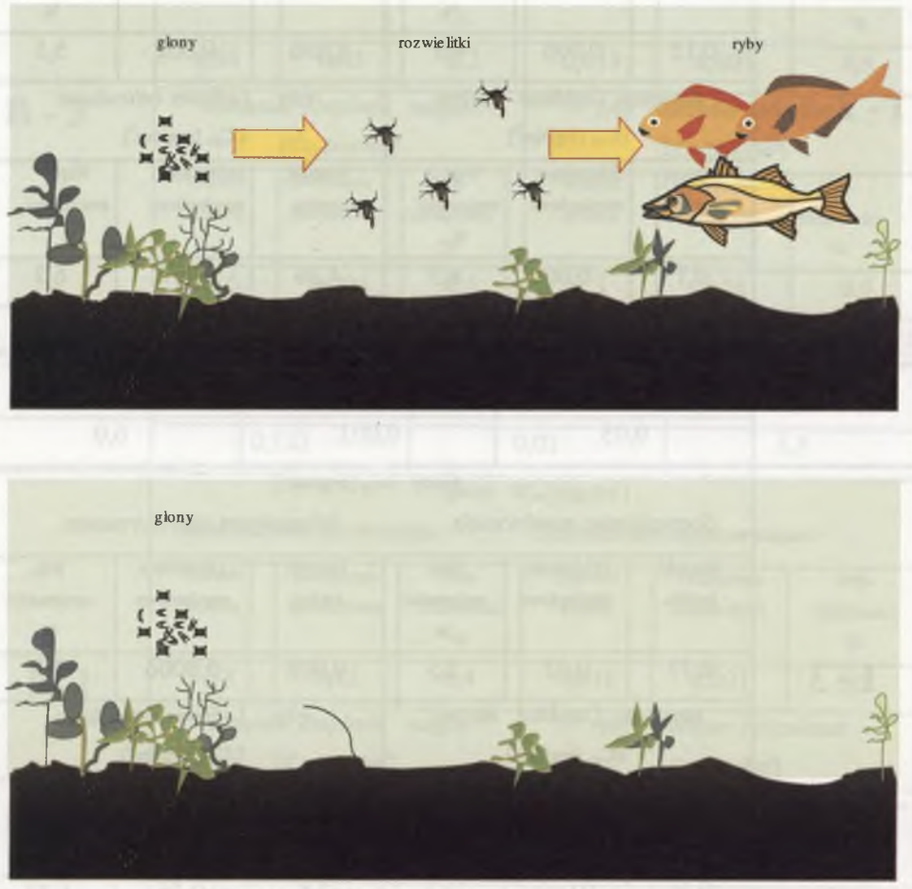
Tabela 5.6e

Wartości uzyskane w testach toksyczności

Chlorki	Stosowane organizmy testowe					
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,15	0,006	4,0	0,036	0,002	5,5
I - 2	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,7	0,06	8,5	4,36	0,27	6,2
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,05		0,003		6,0	
	glony IC_{50} [mg/dm^3]					
	Scenedesmus quadricauda			*Selenastrum capricornutum*		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,77	0,02	2,5	0,008	0,0006	7,5
I - 3	skorupiaki *Daphnia magna* EC_{50} [mg/dm^3]			ryby *Lebistes reticulatus* LC_{50} [mg/dm^3]		
	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wsp. zmienności %
	0,29	0,008	2,7	2,4	0,15	6,25
	bakterie *Vibrio fischeri* EC_{50} [mg/dm^3]					
	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Wsp. zmienności %	
	0,08		0,007		8,7	

Oceny toksyczności badanych związków w odniesieniu do kryterium ich szkodliwości dla biocenoz wodnych dokonano uwzględniając najniższe wartości (LC_{50},LC_{50},EC_{50}) danego związku (tab.5.6.a-e) i odnosząc je do klasyfikacji stosowanej w krajach Unii Europejskiej (tab.2.1).

Zgodnie z tą klasyfikacją badane związki należy zaliczyć do silnie toksycznych dla środowiska wodnego.



Rys. 5.9. Przerwanie łańcucha pokarmowego wobec toksycznego działania czwartorzędowych soli amoniowych
Fig. 5.9. Illustration of food chain breaks underneath toxic influence of QAS

Ze względu na to, że badania toksyczności czwartorzędowych soli amoniowych prowadzone były na przedstawicielach poszczególnych poziomów troficznych ekosystemu wodnego, można ocenić, w którym miejscu łańcucha pokarmowego mogą nastąpić zakłócenia w liczebności organizmów. Ponieważ najwrażliwszą grupą na działanie badanych preparatów okazały się glony (organizmy najniższego poziomu troficznego), więc istnieje prawdopodobieństwo zakłócenia pobierania i przyswajania pokarmu przez organizmy reprezentujące kolejne ogniwa łańcucha troficznego (konsumentów I i II rzędu). W sytuacji znacznego przekroczenia stężenia bezpiecznego dla organizmów wodnych może dojść do eliminacji poszczególnych gatunków w łańcuchu troficznym i zaniku biocenozy (rys. 5.9).

5.1.2. Badanie zahamowania wzrostu pędu i korzeni rośliny szerokolistnej *Sinapis alba* i *Hordeum sativum*

Testy toksyczności prowadzono dla nasion przy siewie w wazonach dla trzech grup czwartorzędowych soli amoniowych. Do badania ich wpływu na florę glebową wytypowano, zgodnie z zaleceniami OECD [166] po jednym przedstawicielu roślin jednoliściennych (*Hordeum sativum*) i dwuliściennych (*Sinapis alba*). Jako podłoże wykorzystano piasek, z uwagi na jego niską pojemność sorpcyjną, co umożliwiło stworzenie najbardziej niekorzystnych warunków glebowych, tj. takich, w których toksyczność badanych związków może być największa. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najmniej toksyczne dla rośliny zarówno jednoliściennej, jak i dwuliściennej okazały się chlorki alkilo(alkoksymetylo) dimetyloamoniowe. Wyznaczone IC_{50} dla korzenia *Sinapis alba* niezależnie od badanego preparatu z tej grupy wynosiło ponad 100 mg/kg $_{gleby}$, natomiast dla łodygi przyjmowało wartości od 211 ± 3,7 mg/kg_{gleby} do 258± 5,9 mg/kg_{gleby} (tabl. 5.7).

Wartości IC_{50} uzyskiwane dla korzenia i łodygi *Hordeum sativum* były od 8 do 10 razy wyższe niż uzyskiwane dla *Sinapis alba* (tab. 5.7-5.8, rys. 5.10). Znacznie mniejsze działanie toksyczne CSA na rośliny jednoliścienne niż dwuliścienne wykazano już wcześniej [82,85].

Tabela 5.7

Porównanie wpływu chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych na *Sinapis alba*

Badane związki	IC_{50} korzenia [mg/kg_{gleby}]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %	IC_{50} łodygi [mg/kg_{gleby}]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %
A – 1	105	2,0	1,9	246	4,2	1,7
A - 2	110	3,8	3,4	258	5,9	2,2
A - 3	102	1,3	1,2	211	3,7	1,7
A – 4	108	2,5	2,3	236	6,8	2,8

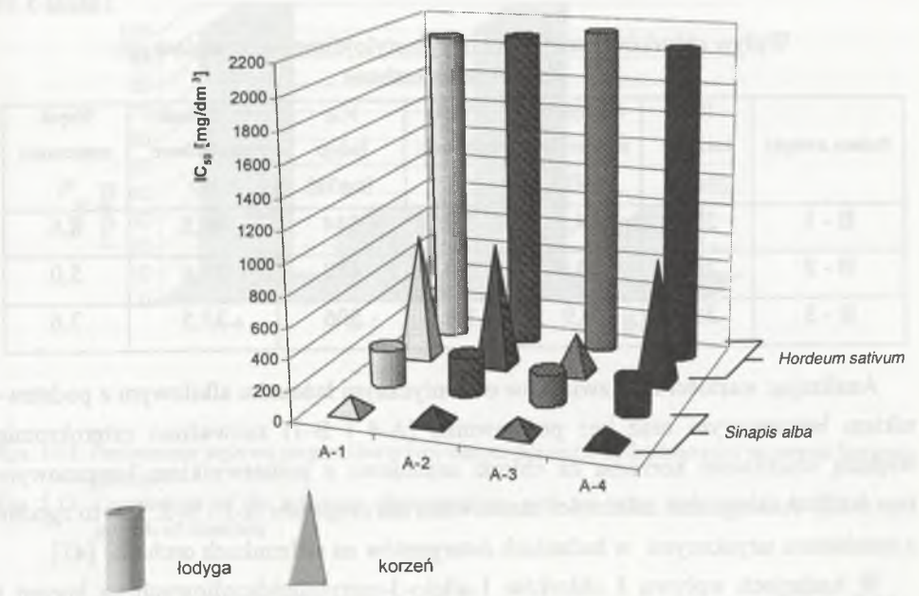
Tabela 5.8

Wpływ chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych na *Hordeum sativum*

Badane związki	IC_{50} korzenia [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %	IC_{50} łodygi [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %
A – 1	830	19,5	2,3	2080	66	3,2
A – 2	825	15,7	1,9	2102	84	3,9
A – 3	864	24,2	2,8	2155	98	4,5
A – 4	818	23,9	2,9	2075	53	2,5

Natomiast w grupie chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych wyznaczone IC_{50} dla gorczycy preparatów B-1 do B-3 wynosiło około 25 mg/kg_{gleby} dla korzenia i około 45 mg/kg_{gleby} dla łodygi (tab.5.9). W badaniach tej samej grupy związków zauważono zróżnicowane wyniki w zależności od budowy łańcucha hydrofobowego [81,88]. Najwyższą toksyczność zaobserwowano dla związku, którego łańcuch hydrofobowy miał zaledwie 4 atomy węgla. Najmniej toksyczny dla gorczycy okazał się preparat nie zawierający atomu tlenu w cząsteczce. Wprowadzenie więc tlenu do łańcucha hydrofobowego spowodowało wzrost toksyczności badanych związków, przy czym długość łańcucha powyżej 8 atomów węgla nie miała żadnego znaczenia.

Podobne wyniki uzyskał Ernst [41], gdzie w badaniach nad fitotoksycznym działaniem surfaktantów niejonowych i kationowych na orchideę obserwował obniżenie toksycznosci wraz ze wzrostem długości łańcucha.



Rys. 5.10. Zróżnicowany wpływ chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych na rośliny jednoliścienne i dwuliścienne

Fig. 5.10. Differences in effect of (alkoxymethyl)alkyldimethylammonium chlorides on monocotyledonous and dicotyledonous plants

W grupie chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych także zaobserwowano prawie dziesięciokrotnie mniejszy wpływ badanych preparatów na łodygę i korzeń jęczmienia niż gorczycy (tab. 5.9–5.10, rys.5.11). Wyniki wskazują również, że obecność podstawnika benzenowego w cząsteczce związków powoduje zwiększenie działania toksycznego chlorków amoniowych na korzeń i łodygę *Sinapis alba* i *Hordeum sativum* (tab.5.9–5.10).

Tabela 5.9

Wpływ chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych na *Sinapis alba*

Badane związki	IC_{50} korzenia [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %	IC_{50} łodygi [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %
B - 1	23,2	1,5	6,4	44,3	2,6	5,8
B - 2	25,2	0,7	2,7	42,0	1,4	3,3
B - 3	25,1	1,2	4,7	53,5	3,6	6,7

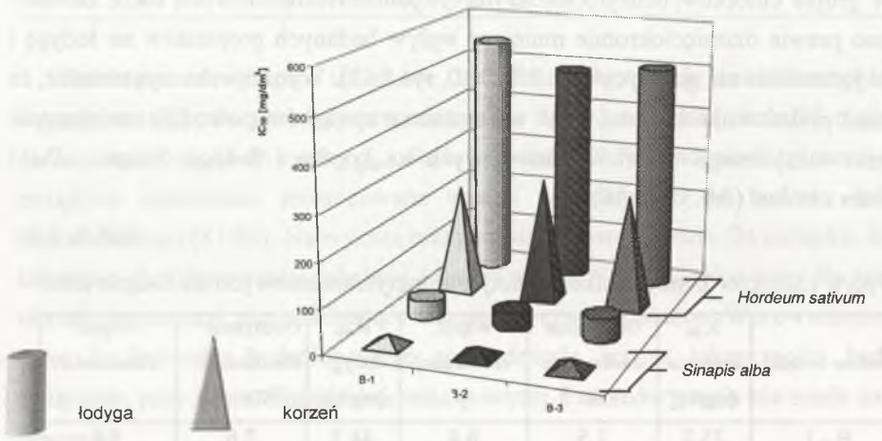
Tabela 5.10

Wpływ chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych *na Hordeum sativum*

Badane związki	IC_{50} korzenia [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %	IC_{50} łodygi [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %
B - 1	238	14,5	6,0	544	46,8	8,6
B - 2	275	13,9	5,0	489	24,6	5,0
B - 3	254	9,9	3,8	506	38,5	7,6

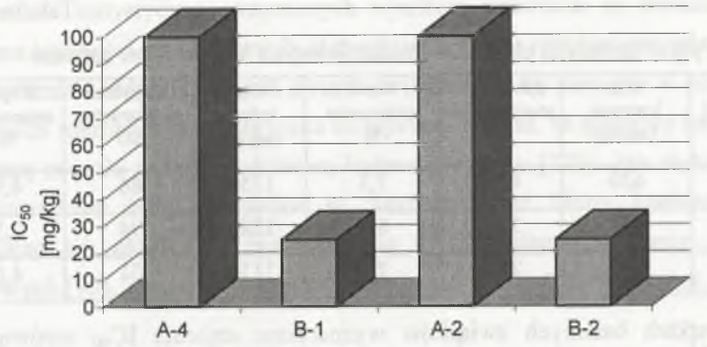
Analizując wartości IC_{50} związków o identycznym łańcuchu alkilowym z podstawnikiem benzenowym oraz bez podstawnika (A-4 i B-1) zauważono czterokrotnie większą wrażliwość korzenia na chlorki amoniowe z podstawnikiem benzenowym (rys.5.12). Analogiczne zależności zanotowano dla preparatu A-2 i B-2. Jest to zgodne z rezultatami uzyskanymi w badaniach detergentów na sadzonkach orchidei [41].

W badaniach wpływu 3 chlorków 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych na korzeń i łodygę *Sinapis alba* i *Hordeum sativum* stwierdzono, że najbardziej toksyczny z badanych preparatów okazał się I-3, bowiem wartość jego IC_{50} wyznaczona dla korzenia gorczycy wynosiła 35,7 $\pm$ 3,2 mg/kg $_{gleby}$, a dla łodygi 113 $\pm$ 15,6 mg/kg $_{gleby}$ (tab.5.11) i odpowiednio dla jęczmienia 350 $\pm$ 25,2 mg/kg $_{gleby}$ i 1100 $\pm$ 51 mg/kg $_{gleby}$ (tab. 5.12).



Rys. 5.11. Zróżnicowany wpływ chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych na rośliny jednoliścienne i dwuliścienne

Fig. 5.11. Differences in effect of benzyl(alkoxymethyl)dimethylammonium chlorides on monocotyledonous and dicotyledonous plants



Rys. 5.12. Porównanie wpływu preparatów o tym samym łańcuchu hydrofobowym na wzrost korzenia gorczycy

Fig. 5.12. Comparison of the influence of preparations with the same hydrophobic chain on root growth of charlock

Tabela 5.11

Wpływ badanych chlorków imidazoliowych na *Sinapis alba*

Badane związki	IC_{50} korzenia [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %	IC_{50} łodygi [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %
I - 1	43,2	2,5	5,7	124,0	9,6	7,7
I - 2	58,2	4,7	8,0	142,0	13,4	9,4
I - 3	35,7	3,2	8,9	113,5	6,7	5,9

Zastąpienie atomu siarki w podstawniku alkilowym (I-3) atomem tlenu (I-1) spowodowało zmniejszenie toksyczności preparatu w stosunku do korzenia i łodygi gorczycy, gdyż IC_{50} wzrosło odpowiednio z wartości 35,7 $\pm$ 3,2 do 43,2 $\pm$ 2,5 mg/kg$_{gleby}$ oraz z 113,5 $\pm$ 6,7 do 124 $\pm$ 9,6 mg/kg$_{gleby}$ (tab.5.11). Podobne spostrzeżenia zaobserwowano dla korzenia i łodygi jęczmienia. W przypadku tej rośliny wartość IC_{50} dla korzenia wzrosła z 350 $\pm$ 25,2 do 630 $\pm$ 46,5 mg/kg $_{gleby}$, a dla łodygi z 1110 $\pm$ 51 do 1750 $\pm$ 86 mg/kg $_{gleby}$ (tab.5.12).

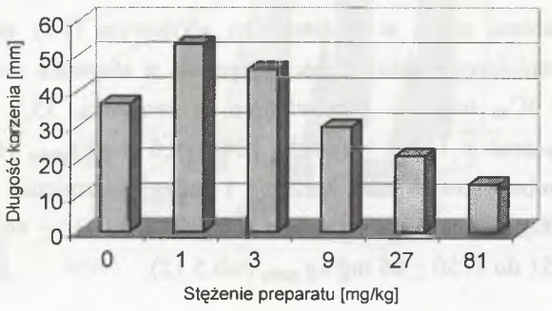
Tabela 5.12

Wpływ badanych chlorków imidazoliowych na *Hordeum sativum*

Badane związki	IC_{50} korzenia [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %	IC_{50} łodygi [mg/kg]	Odchylenie standardowe SD	Współ. zmienności %
I - 1	630	46,5	7,3	1750	86	4,9
I - 2	470	38,7	8,2	1280	94	7,3
I - 3	350	25,2	7,2	1110	51	4,6

Dla wszystkich badanych związków wyznaczone stężenia IC_{50} zarówno dla korzenia, jak i łodygi charakteryzowały się niskimi współczynnikami zmienności, mieszczącymi się w zakresie 1,3 do 9,4%.

Choć wykazano fitotoksyczne działanie preparatu I-1 na korzeń *Sinapis alba*, to przy najniższych stężeniach obserwowano stymulację wzrostu korzeni tej rośliny pod wpływem ww. preparatu (rys.5.13). Najprawdopodobniej wynika to z nieskomplikowanej budowy badanego chlorku 1-decylo-3-heksylooksymetylo-imidazoliowego i jego podobieństwa do histydyny - aminokwasu zawierającego pierścień imidazolowy [213]. Histydyna jest, obok argininy, jednym z dwóch aminokwasów spotykanych we wszystkich białkach występujących w przyrodzie [45]. Wydaje się więc, że w niskich stężeniach własności stymulacyjne tych i podobnych związków przeważają nad inhibicją i wywołują zwiększony przyrost upraw. Zaobserwowana stymulacja wzrostu korzenia jest zjawiskiem korzystnym dla roślin, ponieważ dłuższe korzenie umożliwiają lepsze umocowanie w podłożu, a także głębszą penetrację w poszukiwaniu wody i nutrientów. Podobne spostrzeżenia zaobserwowano w badaniach dipolioksyetylenoalkiloamin [65].



Rys. 5.13. Wpływ stężenia chlorku 1-decylo-3 heksyloksymetyloimidazoliowego na wzrost korzenia
Fig. 5.13. Influence of concentration of 1-decyl-3-hexyloxymethylimidazolium chloride on root growth

Analiza statystyczna otrzymanych wyników pozwoliła na stwierdzenie, iż dla poziomu istotności α=0,05 istniały statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami IC_{50} korzenia i łodygi badanych związków (tabela 5.13), zarówno w przypadku traw, jak i roślin szerokolistnych. Wynika to zapewne z faktu, że korzenie łatwiej niż liście pobierają związki polarne, jakimi są badane preparaty [278]. Jak wykazały badania, czwartorzędowe sole amoniowe są wiązane przez błony komórek roślinnych zakłócając ich aktywność enzymatyczną i powodując denaturację komponentów białkowych [95]. Zjawisko to mogło występować w komórkach korzeni.

Tabela 5.13

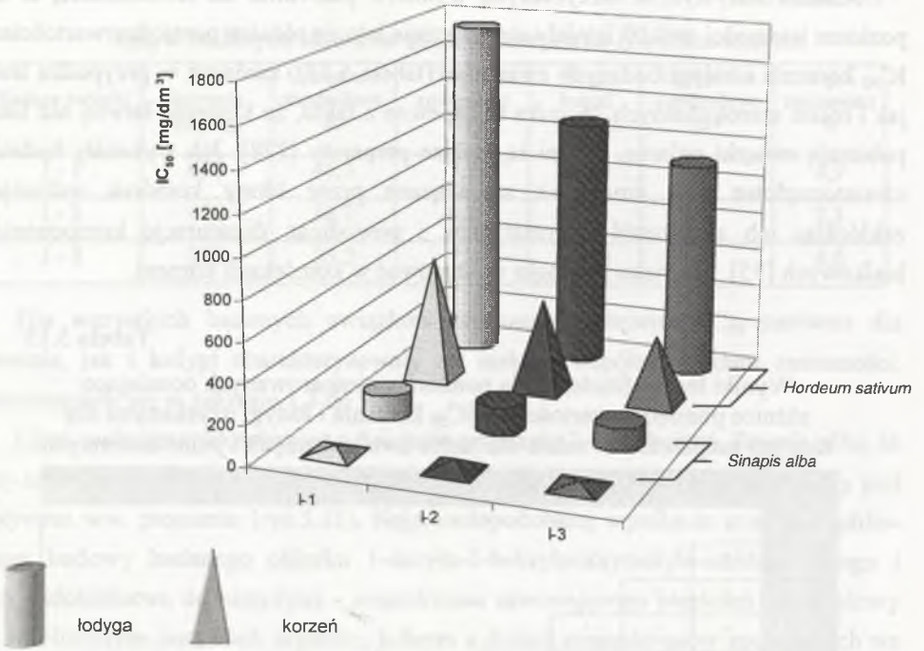
Wyniki testu t-Studenta dla pomiarów niesparowanych oceniające różnice pomiędzy wartościami IC_{50} korzenia i łodygi uzyskanymi dla różnych preparatów w teście dla roślin dwuliściennych i jednoliściennych

	A - 1	A - 2	A - 3	A - 4	B - 1	B - 2	B - 3	I - 1	I - 2	I - 3
A - 1										
A - 2	+									
A - 3	+	+								
A - 4	+	+	+							
B - 1	+	+	+	+						
B - 2	+	+	+	+	+					
B - 3	+	+	+	–	+	+				
I - 1	+	+	+	+	+	+	+			
I - 2	+	+	–	+	+	+	+	+		
I - 3	+	+	+	+	–	–	+	+	+	

„+" – różnice wartości IC_{50} istotne statystycznie na poziomie ufności 95%
„-" – różnice wartości IC_{50} nieistotne statystycznie na poziomie ufności 95%

Zróżnicowanie toksycznego oddziaływania na rośliny jednoliścienne i dwuliścienne (rys.5.10,5.11,5.14) wskazuje na możliwość wykorzystania analizowanych środków jako herbicydów. Całkowity brak toksycznego wpływu na jęczmień sugeruje, iż nadają się one na środki ochrony tego gatunku zboża przed chorobami wywołanymi przez rdze – grzyby należące do gromady podstawczaków, gdyż większość badanych związków wykazuje jednocześnie doskonałe właściwości grzybobójcze.

Ponieważ maksymalne stężenie CSA, jakie można spotkać w glebach wynosi 1,25- 9,0 mg/kg_{gleby} [59,254], zatem badane preparaty nie powinny stanowić zagrożenia dla opryskiwanych roślin okrytonasiennych. Efekty fitotoksyczne mogą się pojawić jedynie w przypadku katastrof ekologicznych i raczej na glebach piaszczystych, o niskiej pojemności sorpcyjnej.



Rys. 5.14. Wpływ badanych chlorków imidazoliowych na rośliny jednoliścienne i dwuliścienne
Fig. 5.14. Differences in effect of imidazolium chlorides on monocotyledonous and dicotyledonous plants

5.2. Badanie genotoksyczności CSA według testu na zdolność do naprawy DNA u *Bacillus subtilis*

Różnorodność zastosowania czwartorzędowych soli amoniowych powoduje duże możliwości przedostawania się ich do organizmu człowieka i ewentualnego negatywnego oddziaływania na niego. Ponieważ uważa się, że substancje powierzchniowo czynne wzmagają działanie związków rakotwórczych [271], stąd celowe wydało się zbadanie właściwości mutagennych nowo zsyntetyzowanych czwartorzędowych soli amoniowych. W badaniach wykorzystano test bakteryjny na zdolność reparacji DNA u *Bacillus subtilis* [109]. Zastosowana w badaniach metoda polegająca na użyciu bakterii *B.subtilis* w celu zbadania aktywności mutagennej wytypowanych związków, chociaż nie stosowana powszechnie, pozwala uzyskać w miarę szybko wiarygodne wyniki. Wyniki badań nad właściwościami mutagennymi badanych związków przedstawiono w tabelach 5.14 i 5.15.

Uzyskane wyniki wskazują, że preparaty te nie wykazywały właściwości mutagennych, jedynie związek B-2 przy stężeniu 10 mg/dm^3 okazał się substancją potencjalnie mutagenną. Niemniej jednak jest to stężenie związku nie spotykane w wodzie do picia, jak również w wodach naturalnych. Stwierdzono bowiem, że w rzekach Francji i Holandii występują kationowe związki powierzchniowo czynne w stężeniach 5-16 μg /dm^3, natomiast w Menie w pobliżu Frankfurtu wykrywano je w ilości 0,01-0,03 mg/dm^3 [32,254]. W Polsce natomiast nie monitoruje się tych substancji w wodach powierzchniowych. W niewielu pracach, w których omawiono właściwości genotoksyczne CSA stosując testy bakteryjne, również wykazano brak działania mutagennego tej grupy związków [27,60,84,86,115,254,262].

Zdarza się, że toksyczność badanych soli maskuje ich mutagenne działanie [172]. Bakterie bowiem w środowiskach naturalnych wykazują ładunek ujemny, gdyż pH środowiska jest najczęściej powyżej stałej dysocjacji grup funkcyjnych występujących w zewnętrznej warstwie ich ścian komórkowych, tj. przede wszystkim kwasów tejchojowych i tejchuronowych u bakterii gramdodatnich oraz białek u bakterii gramujemnych. Dlatego też kationy czwartorzędowych soli amoniowych reagują z powierzchnią ściany komórkowej powodując zakłócenia w transporcie substancji chemicznych do i na zewnątrz komórki, wykazując przede wszystkim działanie cytotoksyczne [94], a nie genotoksyczne.

Niemniej jednak przeprowadzone wcześniej badania właściwości antybakteryjnych chlorków A-3 i A-4 [214] wykazały, że MBC (minimum bactericidal concentration) w stosunku do szczepu *B. subtilis,* w zależności od badanego związku, wynosiło odpowiednio 9,9 i 2,9 mg/dm^3. Ponieważ wykazano, że badane substancje nie oddziałują genotoksycznie nie tylko w wyżej wymienionych stężeniach, ale również i w koncentracjach niższych, zatem nie powinno było następować maskowanie mutagennego działania badanych soli przez ich toksyczne właściwości.

Tabela 5.14

Genotoksyczne działanie chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych

Badany związek	Stężenie związku [mg/l]	Strefy zahamowania wzrostu [mm]		Różnica stref zahamowania wzrostu [mm]	Efekt mutagenny
		M45Rec$^-$	H17Rec$^+$		
A-1	10	21	19	2	-
	3	20	19	1	-
	1	18	17	1	-
	0,5	17	16	1	-
	0,1	17	16	1	-
	0,01	13	13	0	-
A-2	10	22	20	2	-
	3	22	21	1	-
	1	24	24	0	-
	0,5	22	22	0	-
	0,1	18	18	0	-
A-3	10	17	15	2	-
	3	16	14	2	-
	1	16	15	1	-
	0,5	15	15	0	-
	0,1	15	15	0	-
	0,01	14	14	0	-
A-4	10	11	9	2	-
	3	10	9	1	-
	1	10	8	2	-
	0,5	9	9	0	-
	0,1	10	9	1	-
	0,01	9	9	0	-

Tabela 5.15

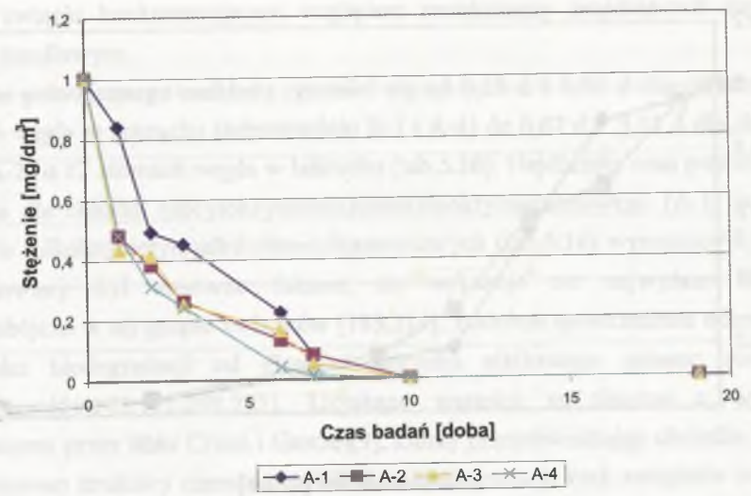
Genotoksyczne działanie chlorków benzylo(alkoksymetylo) dimetyloamoniowych i imidazoliowych

Badany związek	Stężenie związku [mg/l]	Strefy zahamowania wzrostu [mm]		Różnica stref zahamowania wzrostu [mm]	Efekt mutagenny
		M45Rec$^-$	H17Rec$^+$		
B-1	10	28	26	2	-
	3	26	24	2	-
	1	29	28	1	-
	0,5	27	26	1	-
	0,1	28	27	1	-
	0,01	26	25	1	-
B-2	10	26	23	3	+/ -
	3	28	26	2	-
	1	26	26	0	-
	0,5	26	26	0	-
	0,1	26	26	0	-
	0,01	26	26	0	-
B-3	10	28	27	1	-
	3	29	28	1	-
	1	28	28	9	-
	0,5	26	26	0	-
	0,1	26	26	0	-
	0,01	25	25	0	-
I-1	10	23	22	1	-
	3	20	19	1	-
	1	18	17	1	-
	0,5	17	16	1	-
	0,1	17	16	1	-
	0,01	13	13	0	-
I-2	10	24	22	2	-
	3	23	21	2	-
	1	25	24	2	-
	0,5	23	22	1	-
	0,1	18	17	1	-
	0,01	18	18	0	
I-3	10		25	2	-
	3	27	23	2	-
	1	25	25	1	-
	0,5	26	19	1	-
	0,1	20	18	1	-
	0,01	19	19	0	-
		19			

5.3. Biodegradacja czwartorzędowych chlorków amoniowych z podstawnikiem alkoksymetylowym lub alkilotiometylowym

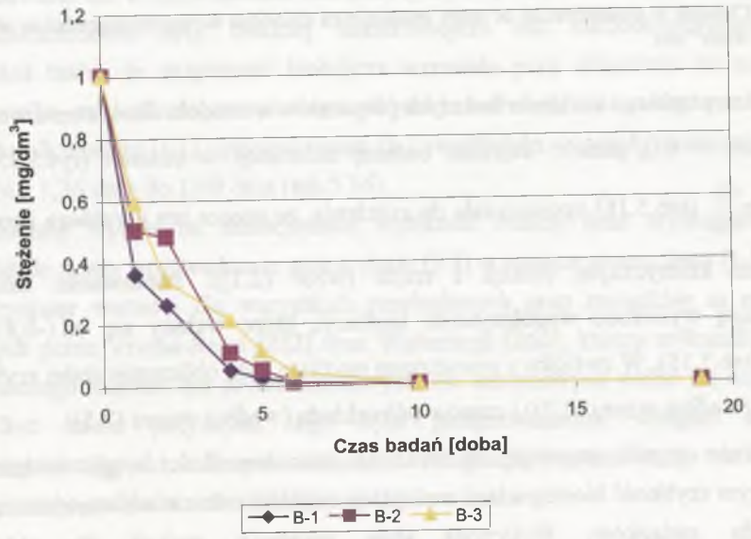
Testy biodegradacji CSA prowadzono w warunkach, gdy badane substraty stanowiły jedyne źródło węgla i energii dla mieszanej populacji drobnoustrojów, którą uprzednio adaptowano do rozkładu tych substratów. Po wprowadzeniu do wszystkich układów modelowych badanych substancji w stężeniu 1 mg substancji aktywnej/dm^3 (czyli zbliżonym do stężeń występujących w ściekach [9]) obserwowano w miarę upływu czasu ich biologiczny rozkład. Dynamika zanikania CSA w wodzie była różna dla poszczególnych grup tych związków (rys.5.15-5.17). Stwierdzono, że najszybciej biodegradacja pierwotna zachodziła dla chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych, bowiem w 6 dniu badań nie stwierdzono obecności tych związków na podstawie reakcji z błękitem disulfinowym (rys.5.16).

Okazało się, że sugestie odnośnie do utrudnionej biodegradacji CSA zawierających w swojej strukturze pierścien benzenowy nie zawsze muszą być słuszne [2,209]. Brak obecności chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych w wodzie stwierdzono po 7-dniowej inkubacji (rys.5.15). Najsłabiej biodegradacja przebiegała w roztworach wodnych, w których obecne były chlorki imidazoliowe. Śladowe ich ilości wykrywano jeszcze w 10 dniu badań, natomiast w 19 dniu badań nie wykryto już obecności tych związków w wodzie (na podstawie reakcji z błękitem disulfinowym) (rys.5.17). Uzyskane wyniki są zbieżne z uzyskanymi przez francuskich badaczy [2], którzy wykazali, że związki alkiloimidazoliowe zanikały w rzece w ciągu 7-14 dni.



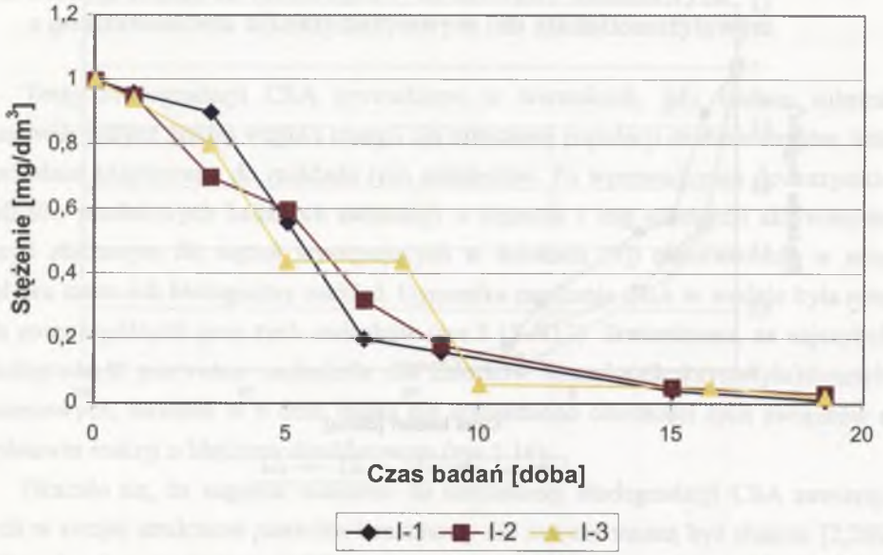
Rys. 5.15. Przebieg zmian stężenia chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych podczas biodegradacji w modelu rzecznym

Fig. 5.15. Changes in concentration of (alkoxymethyl)alkyldimethylammonium chlorides during bio - degradation in "river-water" test



Rys. 5.16. Przebieg zmian stężenia chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych podczas biodegradacji w modelu rzecznym

Fig. 5.16. Changes in concentration of benzyl(alkoxymethyl)dimethylammonium chlorides during biodegradation in "river-water" test



Rys. 5.17. Przebieg zmian stężenia badanych chlorków imidazoliowych podczas biodegradacji w modelu rzecznym
Fig. 5.17. Changes in concentration of study imidazolium chlorides during biodegradation in „river-water" test

Analiza przebiegu rozkładu badanych preparatów w modelu ekosystemu wodnego w układzie c= f(t), gdzie c - stężenie badanej substancji w czasie t (rys.5.15-5.17) i $f(t) = \ln\frac{Cp}{Co}$ (tab.5.16) upoważniała do założenia, że proces ten przebiega zgodnie z równaniem kinetycznym reakcji I rzędu (wzór (2.1)). Poprawność założenia potwierdzają wyliczone współczynniki korelacji, które wahały się od (-0,811) do (-0,971) (tab.5.16). W związku z powyższym możliwe było obliczenie stałej szybkości reakcji K (według wzoru (2.2)) i czasów półrozkładu (według wzoru (2.5)).

Uzyskane wyniki sugerują, że wraz ze wzrostem ilości węgli w łańcuchu alifatycznym szybkość biodegradacji maleje, co znajduje odbicie we wzroście czasów półrozkładu związków. Wyliczone stałe szybkości reakcji dla chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych i benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych są jednak znacznie wyższe od uzyskanych dla preparatów stosowanych w środkach zmiękczających przez firmę Procter & Gamble Company [59], co czyni

badane związki konkurencyjnymi względem zmiękczaczy znajdujących się już w obrocie handlowym.

Czas połowicznego rozkładu zmieniał się od 0,38 d i 0,52 d dla chlorków o 8 atomach węgla w łańcuchu (odpowiednio B-1 i A-4) do 0,67 d i 0,81 d dla chlorków (B-3 i A-2) o 12 atomach węgla w łańcuchu (tab.5.16). Najdłuższy czas połowicznego rozkładu dla chlorku (decyloksymetylo)dimetylooktyloamoniowego (A-1) w grupie chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych (tab.5.16) wynoszący 0,97 dnia spowodowany był zapewne faktem, że wykazuje on najwyższe działanie bakteriobójcze w tej grupie związków [185,214]. Podobne spostrzeżenia odnośnie do zależności biodegradacji od długości łańcucha alkilowego opisane zostały w literaturze [56,145,176,248,265]. Uzyskane wartości są zbieżne z wynikami podawanymi przez Ruiz Cruza i Garcię [9], którzy przeprowadzając obszerne badania nad wpływem struktury chemicznej KZPC na biodegradację tych związków w wodzie rzecznej stwierdzili, że czas połowicznego rozpadu CSA z łańcuchami alkilowymi o 12 atomach węgla wahał się od mniej niż jeden dzień do kilku dni. Prawie dwu- do trzykrotne spowolnienie szybkości biologicznego utleniania chlorków 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych (tab.5.16) w stosunku do pozostałych grup może być spowodowane ich właściwościami bakteriobójczymi [159]. Pernak wykazał [186], że sole imidazoliowe były bardziej bakteriobójcze niż alkilodimetyloamoniowe. Stwierdził także, że aktywność biobójcza wzrastała przy włączeniu do cząsteczki podstawnika cykloalkoksymetylowego. Wyniki wskazują, że zastąpienie jednego łańcucha alkilowego (I-1) cykloheksanem (I-2) wydłużyło czas połowicznego rozpadu związku z 1,36 dnia do 1,69 dnia (tab.5.16).

Mniejszy wpływ na zmniejszenie szybkości reakcji oraz wydłużenie czasu półrozkładu miało wprowadzenie atomu siarki (I-3) w miejsce atomu tlenu (I-1).

Uzyskane wartości dla wszystkich przebadanych grup związków są niższe od podanych przez Vivesa-Rego [252] oraz Wolteringa [262], którzy wykazali, że czas połowicznego rozpadu dla czwartorzędowych soli amoniowych wahał się od 4 do 14 dni. Być może przyczyną tego była przeprowadzona wstępna adaptacja mikroorganizmów do badanych związków. Adaptacja bowiem może skrócić czas połowicznego rozkładu nawet 14-50 razy [9].

Tabela 5.16

Szybkość biodegradacji badanych czwartorzędowych soli amoniowych

Grupa czwartorzędowych soli amoniowych	Symbol związku	Równanie prostej $\ln\frac{Cp}{Co} = f(t)$	Współczynnik korelacji dla zmiennych c i t R^2	Stała szybkości reakcji (1/d) K ± s	Czas połowicznego rozkładu t_{50} (d)
Chlorki (alkoksymetylo)alkilo-dimetyloamoniowe	A-1	-0,31x + 0,093	- 0,912	O,71 ± 0,08	0,97
	A-2	-0,37x + 0,083	- 0,879	0,85 ± 0,07	0,81
	A-3	-0,39x + 0,093	- 0,811	0,89 ± 0,07	0,77
	A-4	-0,59x + 0,063	- 0,956	1,36 ± 0,1	0,50
Chlorki benzylo(alkoksymetylo)-dimetyloamoniowe	B-1	-0,78x + 0,027	- 0,966	1,8 ± 0,06	0,38
	B-2	-0,67x + 0,06	- 0,889	1,54 ± 0,14	0,45
	B-3	-0,45x + 0,10	- 0,830	1,03 ± 0,05	0,67
Chlorki imidazoliowe	I-1	-0,22x + 0,012	- 0,951	0,5 ± 0,04	1,38
	I-2	-0,18x + 0,023	- 0,971	0,41 ± 0,04	1,69
	I-3	-0,2x + 0,19	- 0,894	0,46 ± 0,06	1,50

Ponieważ na podstawie reakcji związków z błękitem disulfinowym uzyskuje się tylko informacje o wystąpieniu biodegradacji pierwotnej, dlatego też proces śledzono również w oparciu o analizę RWO. Ponadto w trakcie i na końcu procesu badano toksyczność i genotoksyczność powstających produktów biodegradacji. Pomimo uzyskanych różnic w stopniu i szybkości biodegradacji poszczególnych związków, wykazano, że w żadnym przypadku powstające metabolity procesu nie były ani genotoksyczne, ani toksyczne wobec testowanych organizmów (tab. 5.17a,b – 5.19).

Tabela 5.17a

Przebieg biologicznego rozkładu chlorków alkilo(alkoksymetylo)dimetylo - amoniowych w czasie oraz ocena toksyczności i genotoksyczności powstałych metabolitów

Substancja	Stężenie [mg/dm^3]			Czas badań [d] początkowy	10	19
A-1	DBAS			1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm^3	7,0	4,1	0,9
	pH			8,1	8,3	8,2
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
A-2	DBAS			1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm^3	11,8	2,5	1,4
	pH			8,2	8,5	8,4
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie

Oznaczenia: A-1 – chlorek (decyloksymetylo)dimetylooktyloamoniowy, A-2 – chlorek (decyloksymetylo) dodecylodimetyloamoniowy

* tak - oznacza, że badane preparaty były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm^3 w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej,

** nie - oznacza, że badane preparaty nie były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm^3 w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej

Obserwowano także (tab.5.17a,b - 5.19), że kiedy w roztworach wodnych nie identyfikowano obecności KZPC (na podstawie reakcji z DBAS), następowało częściowe usuwanie RWO. Oznaczało to, że zaszła biodegradacja pierwotna związana z utratą właściwości powierzchniowo czynnych cząsteczek, natomiast nie stwierdzono dla żadnego z badanych chlorków całkowitej biodegradacji.

Tabela 5.17b

Przebieg biologicznego rozkładu chlorków alkilo(alkoksymetylo)dimetylo - amoniowych w czasie oraz ocena toksyczności i genotoksyczności powstałych metabolitów

Substancja	Parametr			Czas badań [d] początkowy	10	19
A-3	DBAS		mg/dm³	1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm³	10,4	2,9	1,1
	pH			8,4	8,5	8,4
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		tak*	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
A-4	DBAS		mg/dm³	1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm³	7,5	3,0	0,7
	pH			8,2	8,5	8,3
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		tak*	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
Oznaczenia: A-3 – chlorek dodecylodimetylo(nonyloksymetylo)amoniowy, A-4 – chlorek dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowy						

* tak - oznacza, że badane preparaty były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm³ w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej,

** nie - oznacza, że badane preparaty nie były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm³ w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej

Tabela 5.18

Przebieg biologicznego rozkładu chlorków benzylo(alkoksymetylo)dimetylo-amoniowych w czasie oraz ocena toksyczności i genotoksyczności powstałych metabolitów

Substancja	Parametr			Czas badań [d] początkowy	10	19
B-1	DBAS		mg/dm³	1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm³	9,4	3,1	0,6
	pH			8,3	8,4	8,5
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
B-2	DBAS		mg/dm³	1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm³	7,98	4,5	0,5
	pH			8,4	8,5	8,6
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		nie**	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
B-3	DBAS		mg/dm³	1,0	nieobecne	nieobecne
	RWO		mg/dm³	7,6	2,9	0,8
	pH			8,4	8,5	8,6
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		tak*	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
Oznaczenia: B-1 – chlorek benzylodimetyl(oktyloksymetylo)amoniowy, B-2 – chlorek benzylo(decylo-ksymetylo)dimetyloamoniowy, B – 3 chlorek benzylo(dodecyloksymetylo)dimetyloamoniowy.						

* tak - oznacza, że badane preparaty były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm³ w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej,

** nie - oznacza, że badane preparaty nie były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm³ w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej

Tabela 5.19

Przebieg biologicznego rozkładu chlorków 1-alkilo-3-alkoksymetyloimidazoliowych i chlorku 1-decylo-3-heksylotiometyloimidazoliowego w czasie oraz ocena toksyczności i genotoksyczności powstałych metabolitów

Substancja	Parametr			Czas badań [d]		
				początkowy	10	19
I-1	DBAS		mg/dm³	1,0	śladowe	nieobecne
	RWO		mg/dm³	8,5	2,2	1,2
	pH			7,9	8,3	8,5
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
I-2	DBAS		mg/dm³	1,0	śladowe	nieobecne
	RWO		mg/dm³	10,9	3,1	1,7
	pH			7,9	8,3	8,5
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie
I-3	DBAS		mg/dm³	1,0	śladowe	nieobecne
	RWO		mg/dm³	12,4	4,3	2,1
	pH			8,2	8,5	8,5
	toksyczne	glony		tak*	nie	nie
		ryby		nie**	nie	nie
		skorupiaki		tak*	nie	nie
	genotoksyczne			nie	nie	nie

Oznaczenia: I - 1– chlorek 1– decylo-3-heksyloksymetyloimidazoliowy, I– 2 – chlorek 1- decylo-3-cykloheksyloksymetyloimidazoliowy, I – 3 – chlorek 1-decylo-3-heksylotiometyloimidazoliowy

* tak - oznacza, że badane preparaty były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm³ w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej,

** nie - oznacza, że badane preparaty nie były toksyczne dla organizmów żywych w stężeniach początkowych ≤1 mg/dm³ w uprzednio przeprowadzonych testach toksyczności ostrej

Stwierdzono, że substancje organiczne oznaczane jako (RWO) ulegały biodegradacji w 83,0 do 93,4%, w zależności od badanego związku (tabela 5.20). Do śledzenia procesu biodegradacji całkowitej i zidentyfikowania powstałych metabolitów użyto techniki widmowej ^{1}H NMR i ^{13}C NMR.

Tabela 5.20

Biodegradacja chlorków alkilalkoksymetyloamoniowych po 19 dniach badań

Nazwa chlorku	Usunięcie (%)	
	DBAS	RWO
(decyloksymetylo)dimetylooktyloamoniowy	100	87,0
(decyloksymetylo)dodecylodimetyloamoniowy	100	88,0
dodecylodimetylo(nonyloksymetylo)amoniowy	100	89,4
dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowy	100	90,0
benzylodimetyl(oktyloksymetylo)amoniowy	100	93,4
benzylo(decyloksymetylo)dimetyloamoniowy	100	93,0
benzylo(dodecyloksymetylo)dimetyloamoniowy	100	89,5
1– decylo-3-heksyloksymetyloimidazoliowy	100	85,8
1-decylo-3-cykloheksyloksymetyloimidazoliowy	100	83,0
1-decylo-3-heksylotiometyloimidazoliowy	100	84,4

5.3.1. Mechanizm biodegradacji wybranych chlorków amoniowych

Mechanizm rozkładu chlorków (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych, benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych i imidazoliowych przedstawiono w niniejszej pracy analizując otrzymane widma ^{1}H NMR, ^{13}C NMR dla chlorków: dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego, benzylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego, 1-decylo-3-heksyloksymetyloimidazoliowego i 1-decylo-3-cykloheksyloksymetyloimidazoliowego przed biodegradacją, po 10 dniach, oraz w ostatnim dniu trwania procesu (rys.5.18, 5.19, 5.21, 5.22, 5.25, 5.26, 5.28, 5.29), a także opierając się na przedstawionych w literaturze szlakach przemian innych związków powierzchniowo czynnych [106,160,248]. Wybór związków poddanych analizie nastąpił na podstawie założeń o odmienności rozkładu zależnego od budowy. Preparat B-1 różnił się od A-4 tym, że jeden łańcuch alkilowy został zastąpiony grupą benzylową, natomiast w przypadku preparatów I-1 i I-2 jeden łańcuch hydrofobowy został wymieniony na cykloheksan.

5.3.1.1. Analiza widmowa ^{1}H NMR i ^{13}C NMR substratów przed, w trakcie i w końcowym dniu procesu biodegradacji

Analiza dla chlorku dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego

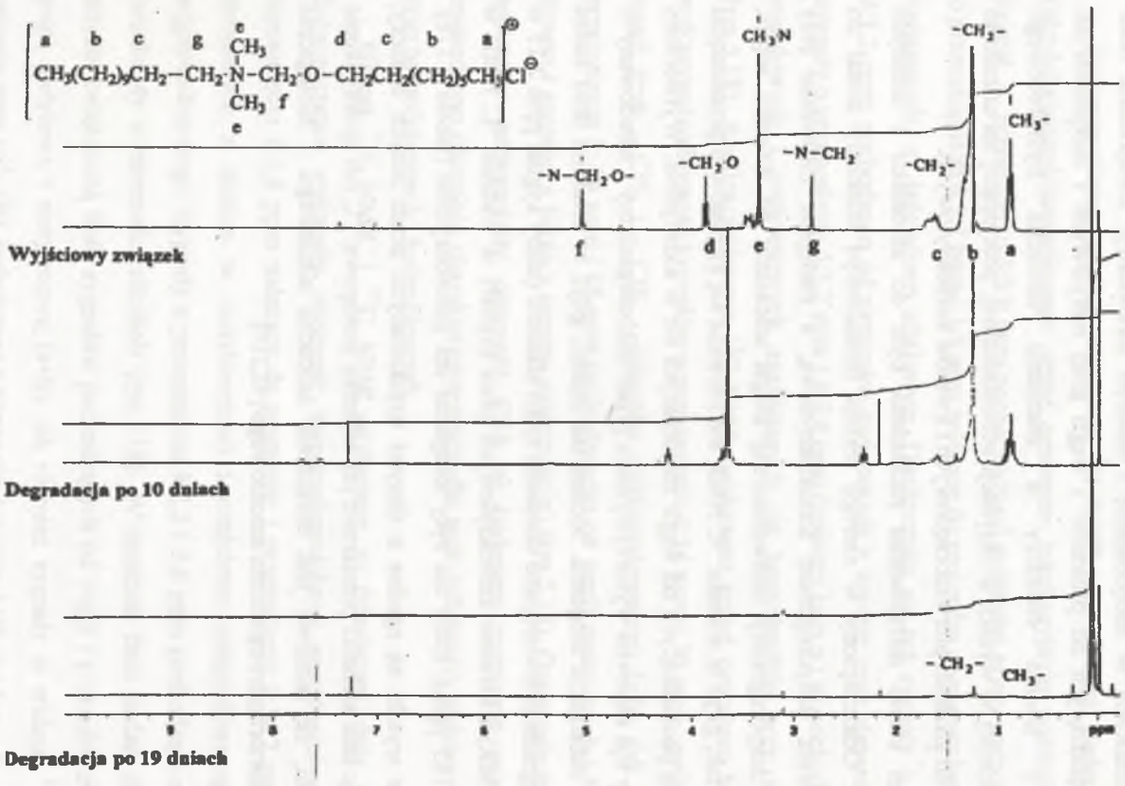
Przeprowadzona analiza widmowa ^{1}H NMR dla chlorku dodecylodimetylo-(oktyloksymetylo)amoniowego przed procesem inkubacyjnym pozwoliła wyróżnić sygnał o przesunięciu δ:0,9 ppm pochodzący od protonów grupy metylowej (a) oraz o przesunięciach δ:1,2 ppm i 1,6 ppm należące do protonów grup metylenowych (b+c) związanych z łańcuchem alkilowym. Uwidoczniły się też sygnały o przesunięciu δ:5,2 ppm pochodzące od protonów związanych z azotem oraz tlenem (f), a także sygnały o przesunięciu δ:3,2 ppm i δ:2,8 ppm (opisany jako e i g) pochodzące od grup metylowych i metylenowych znajdujących się bezpośrednio przy atomie azotu (rys.5.18). Analiza widmowa ^{13}C NMR, wykonana przed procesem biodegradacji, wykazywała obecność sygnałów o przesunięciu δ:14 ppm i 30 ppm, pochodzących od węgli grup - CH_3 i - CH_2 - łańcucha węglowodorowego (a,b), jak i impulsu o przesunięciu δ: 74 ppm i 88 ppm pochodzącego od węgli związanych z tlenem oraz z tlenem i azotem, a także z samym azotem (e+g) (rys.5.19). Oznaczało to, że badania spektralne potwierdziły obecność CSA w badanym roztworze wodnym, gdyż stwierdzono obecność charakterystycznych dla tych substancji podstawników azotu, grup hydrofobowych i hydrofilowych.

Widma ^{1}H NMR i ^{13}C NMR wykonane w dziesiątym dniu prowadzenia doświadczenia wykazały obecność najprawdopodobniej metyloaminy (sygnał o przesunięciu δ:1,4 ppm należący do protonów i przesunięciu δ:34.2 ppm od węgli związanych z azotem w metyloaminie) i częściowo zdegradowanego łańcucha węglowodorowego. Sygnały o przesunięciu δ:2,2 i 3,6 ppm pochodzące od protonów świadczyły o obecności alkoholi (rys.5.18). W ostatnim dniu badań obserwowano jedynie zwiększoną ilość sygnałów pochodzących od węgli i protonów związanych z grupą metylową i metylenową (a+b), jak również sygnały w widmie ^{13}C NMR w zakresie ppm 165-180, świadczące o obecności kwasów karboksylowych.

Na tej podstawie zaproponowano przypuszczalny mechanizm degradacji chlorku dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego (rys.5.20). Proces biodegradacji prawdopodobnie rozpoczynał się w pierwszym etapie rozkładem kationu

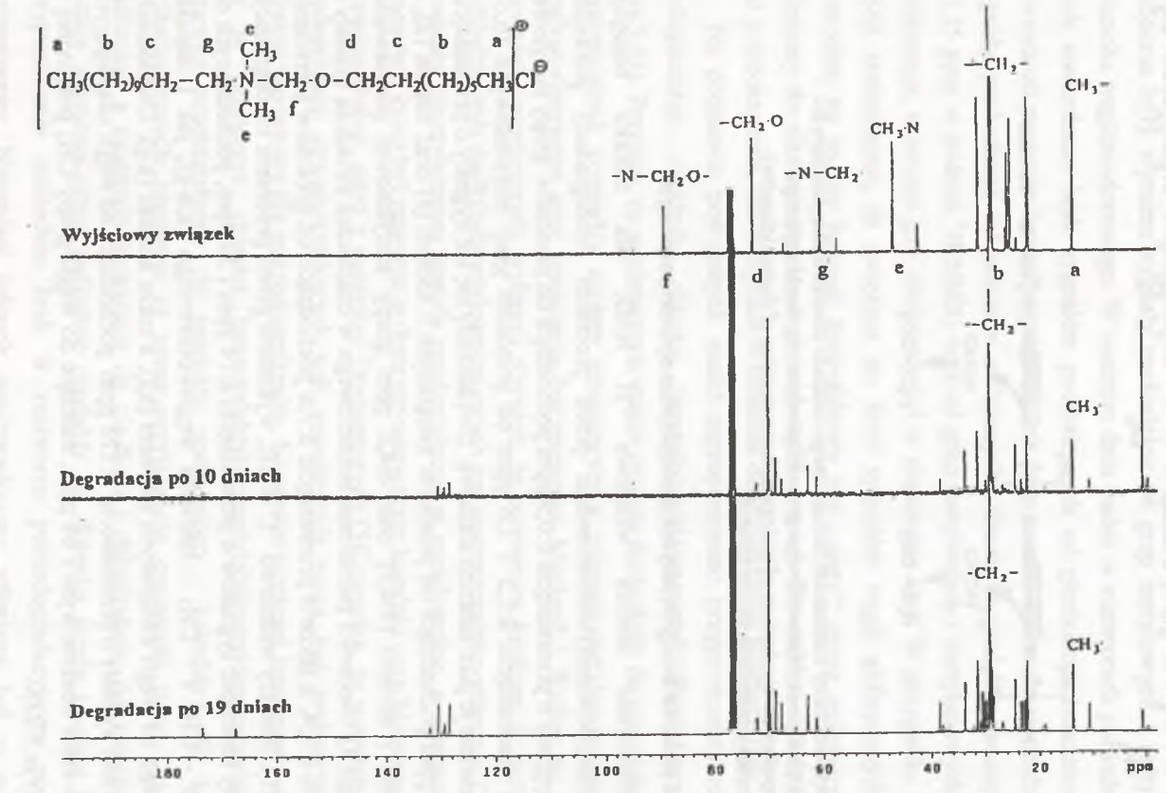
(rozszczepienie wiązania C-N) i utratą właściwości powierzchniowo czynnych, a także toksycznych (tab. 5.17b). Powstawała dimetyloamina, która w wyniku N-demetylacji została przekształcona w metyloaminę i aldehyd mrówkowy. Zwiększona ilość sygnałów pochodzących od protonów i węgli grup metylowych i metylenowych związanych z tlenem świadczy o utlenianiu łańcucha hydrofobowego najprawdopodobniej w wyniku ω-oksydacji subterminalnej, polegającej na utlenieniu węglowodoru do alkoholi pierwszorzędowych i kwasów karboksylowych.

W drugim etapie metyloamina rozkładana była do amoniaku i aldehydu mrówkowego. Odszczepiony w szeregu reakcji formaldehyd utleniany został do mrówczanu przez dehydrogenazę formaldehydową, a następnie mrówczan przy współudziale dehydrogenazy mrówczanowej ulegał utlenieniu do ditlenku węgla. Stwierdza się tak, gdyż w widmie ^{13}C NMR nie zauważa się sygnałów o przesunięciu 195 - 220 ppm pochodzących od węgli znajdujących się w aldehydzie. Wytworzony azot amonowy był zapewne wykorzystywany przez mikroorganizmy i wbudowany w biomasę jako substancja biogenna. Można tak sądzić, gdyż w ostatnim dniu badań procesu biodegradacji stwierdzano obecność tylko alkoholi (słaby sygnał ppm 2,15 w widmie ^{1}H NMR) i kwasów karboksylowych (dwa sygnały w widmie ^{13}C NMR w zakresie 165-185 ppm), które nie były toksyczne ani genotoksyczne (tabela 5.17b). Przedstawione wyniki są zgodne z danymi uzyskiwanymi przez innych badaczy, którzy stosując inne techniki pomiarowe jak technikę izotopową ^{14}C lub spektroskopię IR udowodnili, że możliwe jest odłączenie łańcucha alkilowego i biologiczne utlenienie czwartorzędowego azotu amoniowego [92,219].



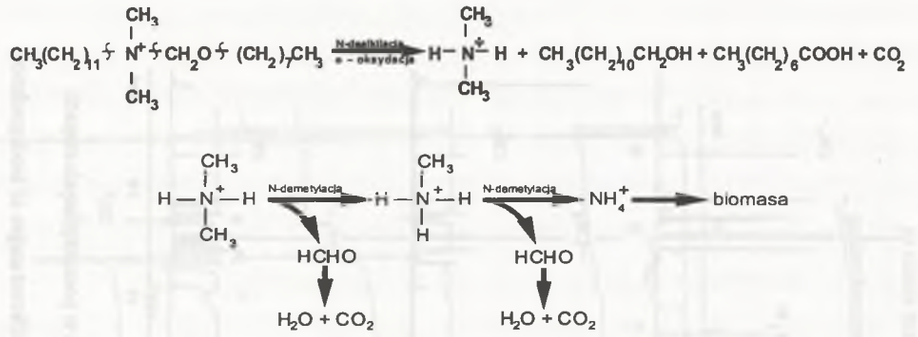
Rys. 5.18. Widmo ^{1}H NMR dla chlorku dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego i w poszczególnych etapach biodegradacji

Fig. 5.18. ^{1}H NMR spectrum for dodecyldimethyl(octyloxymethyl)ammonium chloride in different stages of biodegradation process



Rys. 5.19. Widmo ^{13}C NMR dla chlorku dodecyloodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego i w poszczególnych etapach biodegradacji

Fig. 5.19. ^{13}C NMR spectrum for dodecyldimethyl(octyloxymethyl)ammonium chloride in different stages of biodegradation process



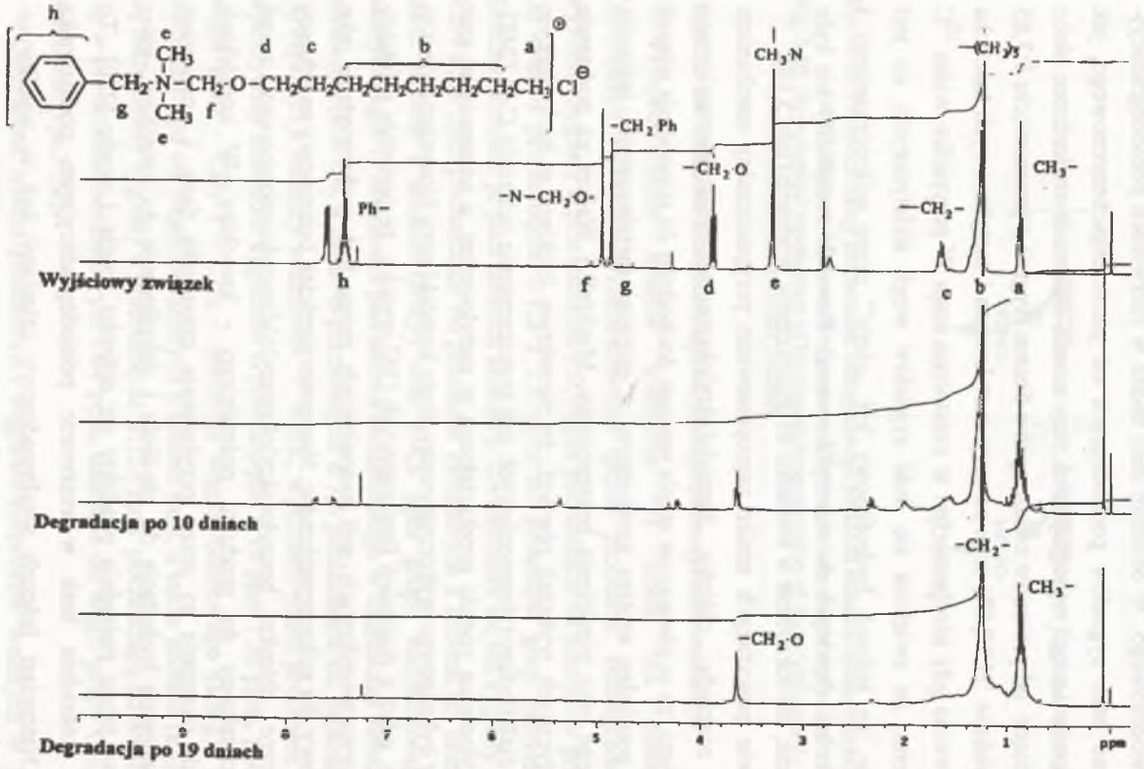
Rys. 5.20. Przypuszczalny mechanizm biologicznego rozkładu chlorku dodecylodimetylo-(oktyloksymetylo)amoniowego przez mikroorganizmy osadu czynnego
Fig. 5.20. Hypothetical mechanism of biological decomposition of dodecyldimethyl-(octyloxymethylammonium chloride

Analiza dla chlorku benzylo(oktyloksymetylo)dimetyloamoniowego

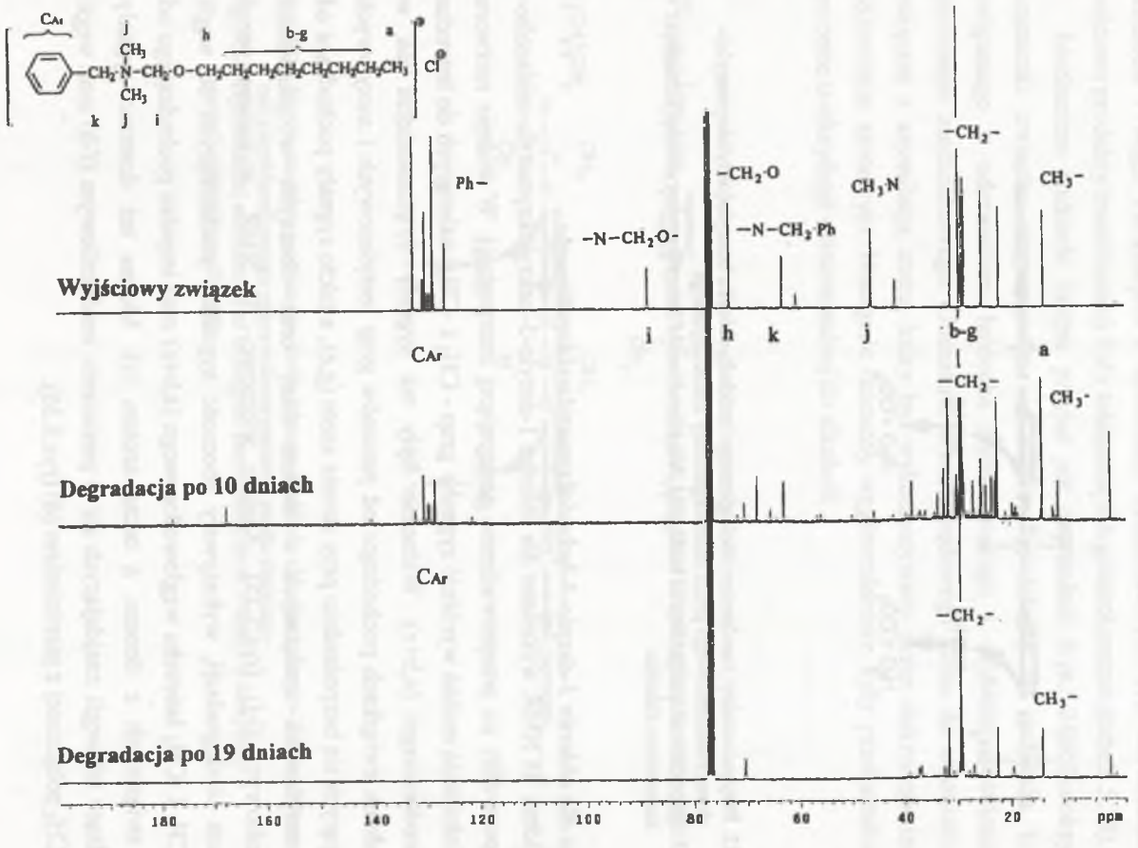
Przeprowadzona analiza widmowa ^{1}H NMR dla chlorku benzylo-(oktyloksylmetylo)dimetyloamoniowego przed procesem biodegradacji pozwoliła wyróżnić sygnały o przesunięciu δ:0,9 ppm pochodzące od protonów grupy metylowej (a) oraz o przesunięciu δ:1,2 i 1,6 ppm od protonów grup metylenowych (b,c). Zidentyfikowano je jako łańcuch alkilowy. Uwidoczniły się też sygnały o przesunięciu δ:3,4 i 3,8 ppm pochodzące od protonów związanych z azotem (e) oraz tlenem (d), a także tlenem i azotem (δ:4,9) oraz δ:4,8 ppm grupy metylenowej podstawnika benzylowego. O obecności pierścienia benzenowego w cząsteczce świadczą sygnały o przesunięciu δ:7,4, a także o przesunięciu δ:7,6 pochodzące od protonów pierścienia (h) (rys.5.21). Analizy widmowe ^{13}C NMR, wykonane przed procesem biodegradacji, wykazywały obecność sygnałów o przesunięciu δ:14 ppm i 30 ppm, pochodzących od węgli grup - CH_3 i - CH_2 - łańcucha węglowodorowego (a,b-g), jak i impulsu pochodzącego od węgli związanych z tlenem (h,i), a także azotem (k-j). Uwidoczniły się także cztery sygnały o przesunięciu δ:128 ppm pochodzące od węgli znajdujących się w pierścieniu benzenowym i 64 ppm, należące do węgli grupy CH_2 połączonej z benzenem (rys.5.22).

Otrzymane widma protonowe i węglowe roztworów wodnych w 10 dniu badań wskazują brak sygnałów pochodzących od protonów (f) i węgli (i,h) związanych z tlenem i z azotem. Słabo zaznaczył swoją obecność sygnał o przesunięciach δ:7,4 ppm i δ:128 ppm pochodzący od protonów i węgli pierścienia benzenowego, co świadczy o przynajmniej częściowej jego biodegradacji. Wykazała swoją obecność najprawdopodobniej metyloamina (sygnał o przesunięciu δ:1,4 ppm należący do protonów i przesunięciu δ:34.2 ppm od węgli związanych z azotem w metyloaminie), a także widoczne były wyraźne sygnały pochodzące od grup metylowych i metylenowych łańcucha węglowodorowego. W ostatnim dniu badań w roztworach pobiodegradacyjnych stwierdzano brak sygnałów pochodzących od pierścienia benzenowego, jak również od protonów i węgli występujących przy azocie, natomiast stwierdzono słabe sygnały pochodzące od protonów związanych z tlenem (sygnał o przesunięciu δ:3,65 i 2,15 ppm w widmie ^{1}H NMR) oraz od grup metylowych i metylenowych łańcucha alkilowego, wówczas gdy nieobecny był w cząsteczce azot. W przypadku widm ^{13}C NMR stwierdzono, że zwiększa się ilość sygnałów węgli alifatycznych, co jest dowodem na to, że łańcuch hydrofobowy był „cięty'' przez mikroorganizmy i utleniany do alkoholi (trudnych do zidentyfikowania). Powstałe metabolity nie były ani genotoksyczne, ani toksyczne w stosunku do organizmów wodnych (tab. 5.18).

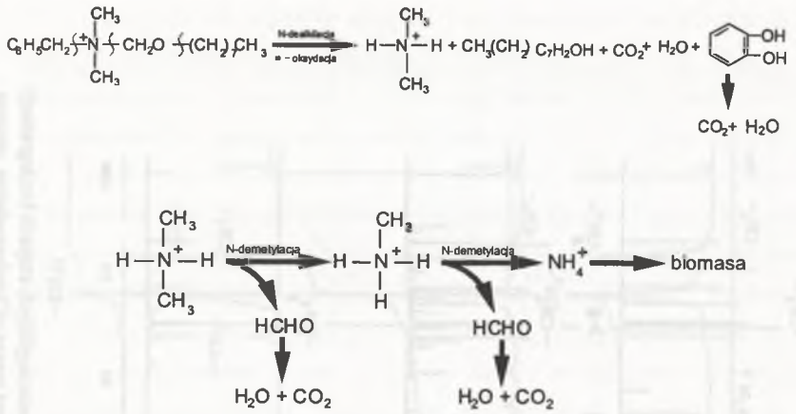
Na podstawie powyższych analiz zaproponowano przypuszczalny mechanizm biologicznego rozkładu chlorku benzylo(oktyloksymetylo)dimetyloamoniowego (rys.5.23). Przyjęto, że w pierwszym etapie procesu dochodziło do rozerwania wiązań występujących pomiędzy azotem amoniowym a grupami metylenowymi łańcucha węglowodorowego oraz pierścienia benzenowego. Mackrell i Walker na podstawie rozważań teoretycznych wykazali również, że pierwszym krokiem w biologicznym rozkładzie soli dialkilodimetyloamoniowych jest rozszczepienie wiązania C-N [248]. Powstała dimetyloamina została przekształcona w metyloaminę, a następnie w azot amonowy, który był zapewne wykorzystywany przez komórki przy biosyntezie. Jest to prawdopodobne, gdyż z doniesień literaturowych [56] wynika, że powstałe produkty biodegradacji czwartorzędowych soli amoniowych mogą być wykorzystane jako substrat wzrostowy dla mikroorganizmów. Następnie pierścień benzenowy znajdujący się w cząsteczce chlorku benzylo(oktyloksmetylo)dimetyloamoniowego został zapewne przekształcony do produktu pośredniego - katechiny. W komórkach prokariotycznych następuje to przez przyłączenie cząsteczki tlenu i utworzenie nadtlenku, a następnie hydratację do cis-diolu i dehydratację do katechiny, która zostaje utleniona przez pośrednie produkty do ditlenku węgla i wody [220]. To przypuszczenie uzasadnia brak w roztworze pobiodegradacyjnym podstawnika benzenowego. Natomiast łańcuch węglowodorowy utleniany był w wyniku ω-oksydacji do alkoholu pierwszorzędowego. Powstałe produkty rozkładu powodowały zmianę odczynu na lekko alkaliczną (tabela 5.18).



Rys. 5.21. Widmo ^{1}H NMR dla chlorku benzylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego i w poszczególnych etapach biodegradacji
Fig. 5.21. ^{1}H NMR spectrum for benzyldimethyl(octyloxymethyl)ammonium chloride in different stages of biodegradation process



Rys. 5.22. Widmo ^{13}C NMR dla chlorku benzylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowego i w poszczególnych etapach biodegradacji
Fig. 5.22. ^{13}C NMR spectrum for benzyldimethy(octyloxymethyl)ammonium chloride in different stages of biodegradation process



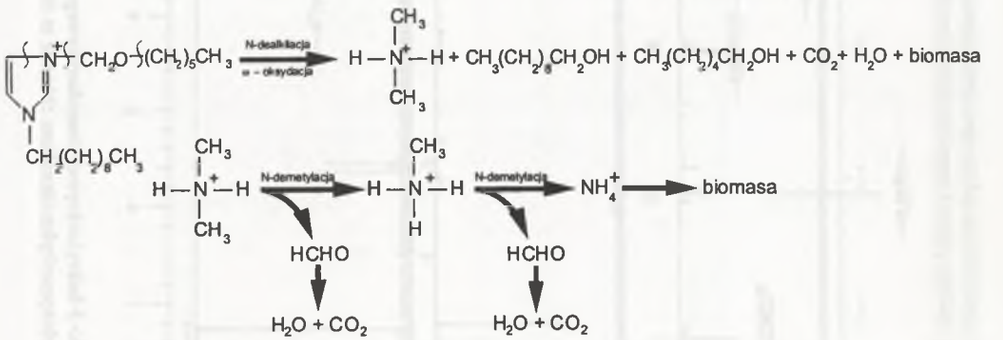
Rys. 5.23. Przypuszczalny mechanizm biologicznego rozkładu chlorku benzylo(oktyloksymetylo)-dimetyloamoniowego przez mikroorganizmy osadu czynnego
Fig. 5.23. Hypothetical mechanism of biological decomposition of benzyl(octyloxymethyl)dimethyl-ammonium chloride

Analiza dla chlorku 1-decylo-3-heksyloksymetylomidazoliowego

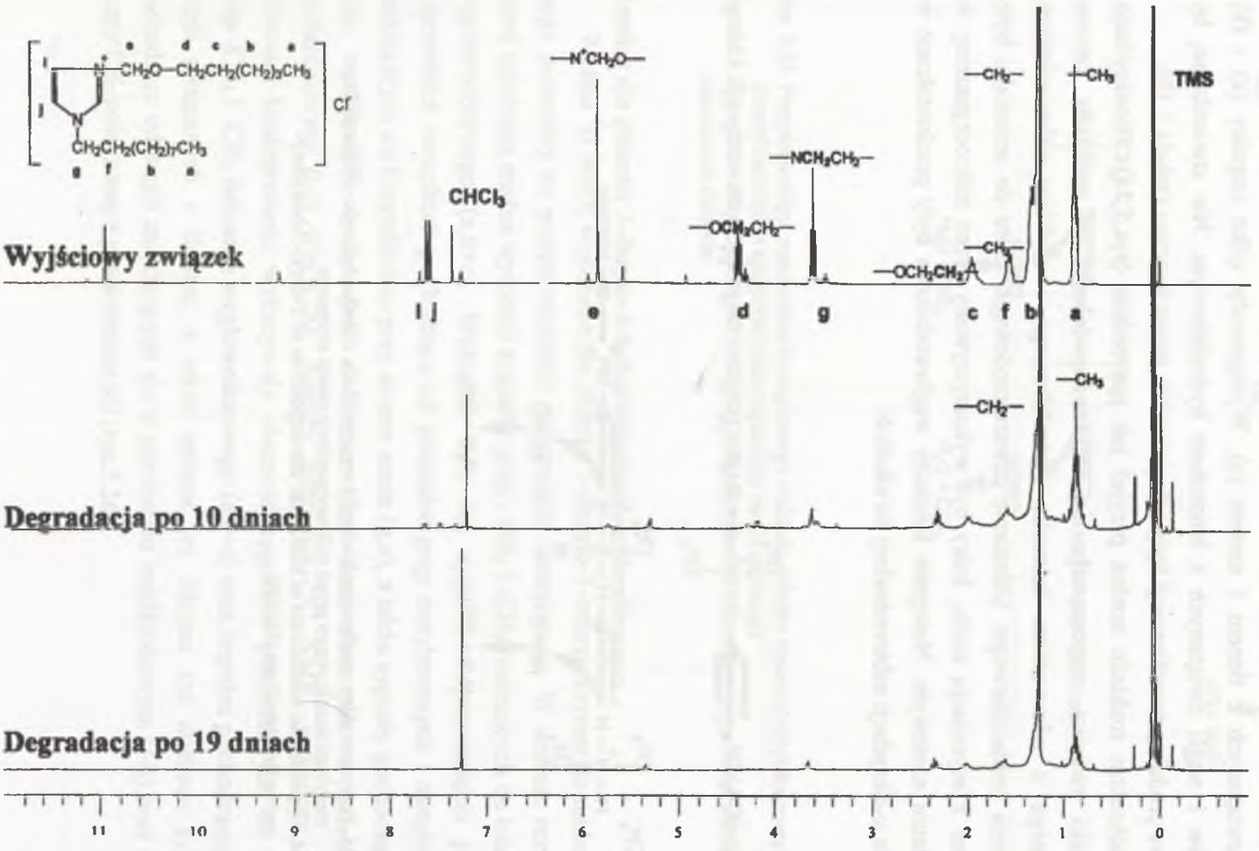
Widma ^1H NMR wykonane dla chlorku 1-decylo-3-heksyloksymetylo-midazoliowego pozwoliły na przeprowadzenie następującej interpretacji. W widmie roztworu przed inkubacją można wyróżnić sygnały grup - CH_3 i -CH_2- należących do łańcucha węglowodorowego (a,b+c). Widoczne były też sygnały o przesunięciu jak w poprzednich związkach pochodzące od protonów grup metylenowych i metylowych znajdujących się bezpośrednio przy atomie azotu (g,e), a także sygnały pochodzące od grup metylowych związanych z tlenem (d,e) oraz obecnych w pierścieniu imidazoliowym (i-j) (rys.5.25). Analizy widmowe ^{13}C NMR, wykonane przed procesem biodegradacji, wykazywały obecność sygnałów pochodzących od węgli grup -CH_3 i -CH_2 łańcucha węglowodorowego (a,b+c) oraz impulsu pochodzącego od węgli związanych z tlenem, a także azotem (e). Można też dostrzec sygnały pochodzące od węgli znajdujących się w pierścieniu imidazoliowym (f-h) oraz węgli grupy CH_2 połączonej z pierścieniem (d) (rys.5.26).

Analiza widm w trakcie oraz w ostatnim dniu prowadzenia doświadczeń wykazała brak sygnałów węgli (f-h) i protonów (h-j) występujących w pierścieniu imidazoliowym, związanych z tlenem i azotem (e). Występowały tylko impulsy (a) i (b) protonów i węgli związanych z łańcuchem hydrofobowym. Nie stwierdzono, by końcowe produkty transformacji były toksyczne lub genotoksyczne (tabela 5.19).

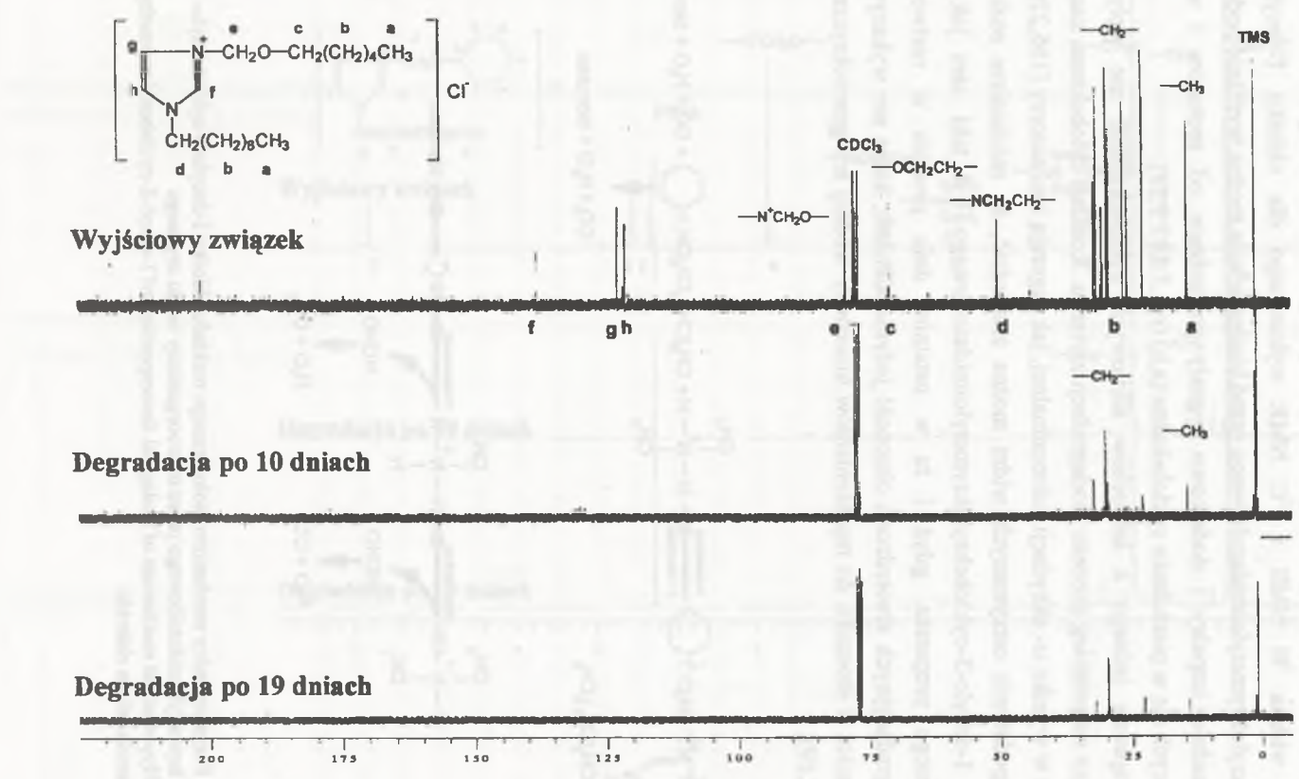
Mechanizm rozkładu można przyjąć jak poprzednio (rys.5.24). Biooksydacja cząsteczki związku rozpoczynała się najprawdopodobniej od rozkładu kationu związanego z oderwaniem łańcucha hydrofobowego i szybkim utlenieniem pierścienia imidazoliowego. Utlenianie czwartorzędowego azotu do amoniaku było związane z asymilacją azotu, który był wykorzystywany przez mikroorganizmy w odżywianiu azotowym. Następnie łańcuchy węglowodorowe były przekształcane w procesie ω-oksydacji subterminalnej do alkoholi.



Rys. 5.24. Przypuszczalny mechanizm biologicznego rozkładu chlorku 1-decylo-3-heksyloksy-metylomidazoliowego przez mikroorganizmy osadu czynnego
Fig. 5.24. Hypothetical mechanism of biological decomposition of 1-decyl-3-hexyloxy-methylimidazolium chloride



Rys. 5.25. Widmo ^{1}H NMR dla chlorku 1-decylo-3-heksylooksymetylomidazoliowego i w poszczególnych etapach biodegradacji
Fig. 5.25. ^{1}H NMR spectrum for 1-decyl-3-hexyloxymethylimidazolium chloride in different stages of biodegradation process



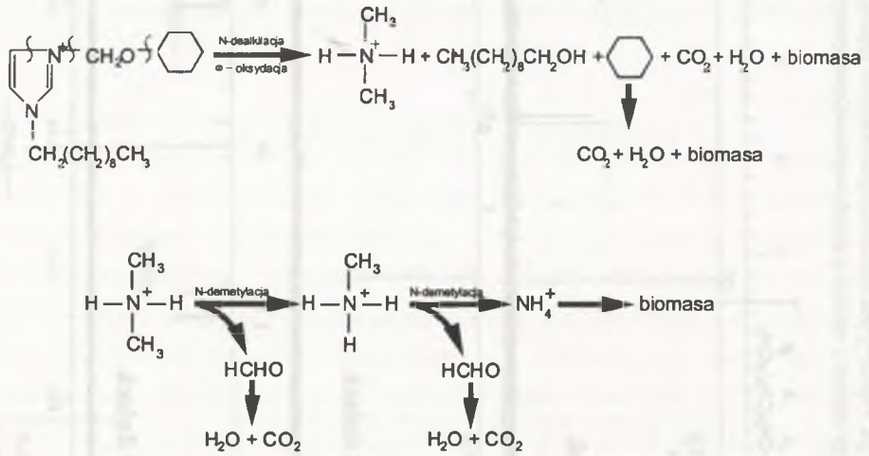
Rys. 5.26. Widmo ^{13}C NMR dla chlorku 1-decylo-3-heksylooksymetylomidazoliowego i w poszczególnych etapach biodegradacji
Fig. 5.26. ^{13}C NMR spectrum for 1-decyl-3-hexyloxymethylimidazolium chloride in different stages of biodegradation process

Analiza dla chlorku 1-decylo-3- cykloheksyloksymetyloimidazoliowego

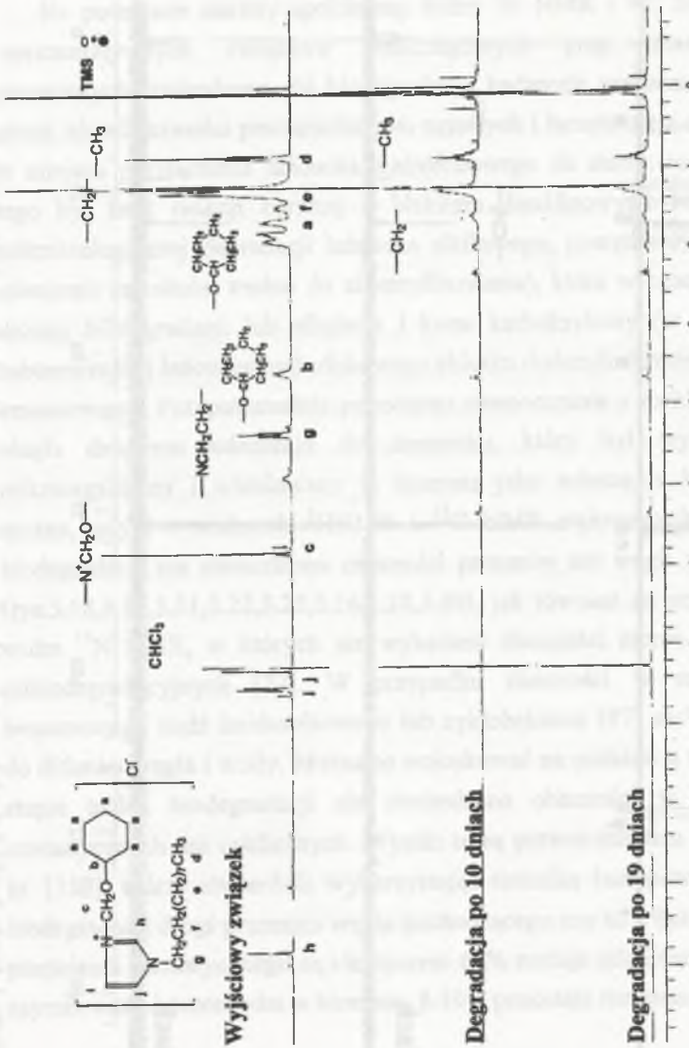
Dla widma ^{1}H NMR i ^{13}C NMR wykonanego dla chlorku 1-decylo-3-cykloheksyloksymetyloimidazoliowego przed biodegradacją można wyróżnić podobne jak uprzednio impulsy i dodatkowo sygnały pochodzące od protonów i węgli znajdujących się w pierścieniu cykloheksanu (a,b) (rys.5.28 i 5.29).

Zastąpienie jednego z łańcuchów alkilowych cykloheksanem nie wpłynęło zasadniczo na przebieg procesu biodegradacji związku. Rozkład cyloheksanu nastąpił zapewne w wyniku ω- oksydacji subterminalnej, jak sugerują inni autorzy [106,220].

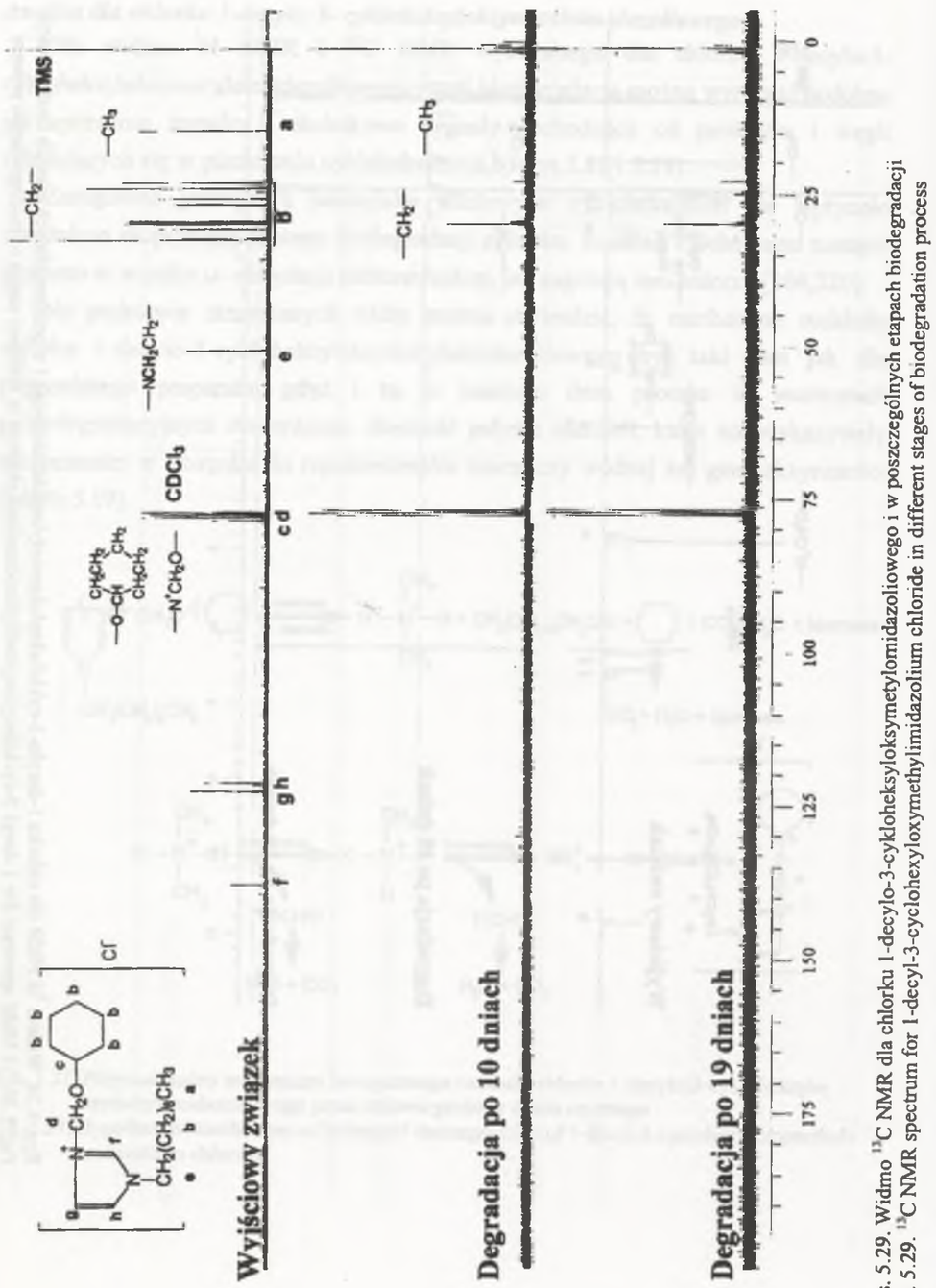
Na podstawie otrzymanych widm można stwierdzić, że mechanizm rozkładu chlorku 1-decylo-3-cykloheksyloksymetyloimidazoliowego był taki sam jak dla poprzedniego preparatu, gdyż i tu w ostatnim dniu procesu w roztworach pobiodegradacyjnych stwierdzono obecność jedynie alkoholi, które nie wykazywały toksyczności w stosunku do reprezentantów biocenozy wodnej ani genotoksyczności (tabela 5.19).



Rys. 5.27. Przypuszczalny mechanizm biologicznego rozkładu chlorku 1-decylo-3-cykloheksylo-ksymetylomidazoliowego przez mikroorganizmy osadu czynnego
Fig. 5.27. Hypothetical mechanism of biological decomposition of 1-decyl-3-cyclohexyloxymethyl-imidazolium chloride



Rys. 5.28. Widmo ^{1}H NMR dla chlorku 1-decylo-3-cykloheksyloksymetylomidazoliowego i w poszczególnych etapach biodegradacji
Fig. 5.28. ^{1}H NMR spectrum for 1-decyl-3-cyclohexyloxymethylimidazolium chloride in different stages of biodegradation process



Rys. 5.29. Widmo ^{13}C NMR dla chlorku 1-decylo-3-cykloheksyloksymetylomidazoliowego i w poszczególnych etapach biodegradacji
Fig. 5.29. ^{13}C NMR spectrum for 1-decyl-3-cyclohexyloxymethylimidazolium chloride in different stages of biodegradation process

Na podstawie analizy spektralnej widm ^{1}H NMR i ^{13}C NMR dla wszystkich reprezentatywnych związków poszczególnych grup czwartorzędowych soli amoniowych stwierdzono, że biodegradacja badanych preparatów związana była z utratą ich właściwości powierzchniowo czynnych i łączyła się z rozkładem cząsteczki w miejscu przyłączenia łańcucha hydrofobowego do atomu azotu. Potwierdzeniem tego był brak reakcji barwnej z błękitem disulfinowym. Następnie, w wyniku mikrobiologicznej degradacji łańcucha alkilowego, powstawały pośrednie produkty utlenienia (alkohole, trudne do zidentyfikowania), które w czasie badań nie ulegały dalszej biodegradacji lub alkohole i kwas karboksylowy (w wyniku ω-oksydacji subterminalnej łańcucha hydrofobowego chlorku dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)-amoniowego). Przypuszczalnie powstająca równocześnie z rozkładem dimetyloamina uległa dalszemu utlenieniu do amoniaku, który był wykorzystywany przez mikroorganizmy i wbudowany w biomasę jako substancja biogenna. Sądzić tak można, gdyż w widmach ^{1}HNMR i ^{13}C NMR wykonanych dla składników po biodegradacji nie stwierdzono obecności protonów ani węgli związanych z azotem (rys.5.18,5.19,5.21,5.22,5.25,5.26,5.28,5.29), jak również na podstawie wykonanych widm ^{15}N NMR, w których nie wykazano obecności atomu azotu w roztworach pobiodegradacyjnych [77]. W przypadku obecności w cząsteczce pierścienia benzenowego bądź imidazoliowego lub cykloheksanu [87] zachodziło utlenianie ich do ditlenku węgla i wody. Można to wnioskować na podstawie tego, że w końcowym etapie badań biodegradacji nie stwierdzano obecności w roztworze pierścieni aromatycznych ani cyklicznych. Wyniki te są potwierdzeniem rezultatów Nielsena i in. [158], którzy stwierdzili wykorzystując technikę izotopową ^{14}C, że w procesie biodegradacji drogi przemian węgla pochodzącego czy to z łańcucha alkilowego, czy pierścienia aromatycznego są identyczne: 62% zostaje utlenione do CO_2, 28-30% jest asymilowane i przechodzi w biomasę, 8-10% pozostaje rozpuszczone w roztworze.

5.4. Ocena ryzyka zagrożenia wód czwartorzędowymi chlorkami amoniowymi

5.4.1. Oszacowanie ryzyka według Schöberla

Metoda ta opiera się na wyznaczeniu przewidywanego stężenia substancji w wodzie (PEC) oraz stężenia (PNEC), które nie będzie wywoływało ujemnych skutków względem najważniejszych przedstawicieli biocenozy wód: bakterii, glonów, skorupiaków i ryb.

Oszacowanie zagrożenia CSA przeprowadzono dla rzeki Kłodnicy przepływającej przez miasto Gliwice, usytuowane na Śląsku.

Przewidywane stężenie czwartorzędowych soli amoniowych w ściekach miejskich w Gliwicach

$$C_{ść} = \frac{X}{Y \cdot Q} \text{ mg/ dm}^3 \qquad (5.1)$$

gdzie: $C_{ść}$ - stężenie CSA w ściekach dopływających na oczyszczalnie ścieków (mg/dm^3), X - konsumpcja CSA w ciągu roku na danym terenie (mg/d), Y - liczba mieszkańców na danym terenie, korzystających z usług w zakresie odprowadzania ścieków, Q - dobowa ilość ścieków przypadająca na mieszkańca (dm^3/Md).

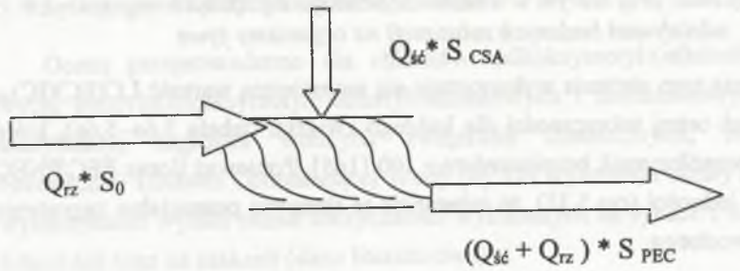
Z informacji uzyskanej od firmy *Brenntag* [13], dystrybującej CSA na Śląsk, wynika, że zapotrzebowanie na te środki w Gliwicach w ciągu roku wynosi 12,5 t, czyli na dzień przypada 34,25 kg. Liczba mieszkańców korzystających z usług w zakresie odprowadzania ścieków w Gliwicach wynosi 206 tysięcy, a ilość produkowanych ścieków w tym mieście wynosi 160 dm^3/Md [167].

Stąd

$$C_{ść} = \frac{34{,}5 \cdot 10^6 mg/d}{206 \cdot 10^3 M \times 160 dm^3/dM} = 1{,}04 \text{ mg/dm}^3 \qquad (5.2)$$

Z przeprowadzonych badań [77] podatności na biodegradację chlorków: alkilo (alkoksymetylo)dimetyloamoniowych, benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych i alkilometyloimidazoliowych w warunkach symulujących pracę oczyszczalni ścieków z osadem czynnym wynika, że są one rozkładalne w 99 ± 0,8%. Wobec tego należy się spodziewać, że ilość ich w ściekach odpływających z oczyszczalni będzie wynosić 0,01 mg/dm^3.

W celu oszacowania przewidywanego stężenia czwartorzędowych soli amoniowych w rzece Kłodnicy poniżej zrzutu ścieków z oczyszczalni w Gliwicach posiłkowano się bilansem ładunków zanieczyszczeń. W rozważaniach teoretycznych założono, że w przekroju koryta przed zrzutem ścieków nie wykrywano obecności CSA.



Legenda

Q_{rz} - przepływ rzeki [m^3/s] S_0 - stężenie CSA w rzece przed zrzutem ścieków [mg/dm^3]

$Q_{ść}$ - przepływ ścieków [m^3/s] S_{CSA} - stężenie CSA w ściekach dopływających do rzeki [mg/dm^3]

S_{PEC} - przewidywane stężenie CSA w rzece po zrzucie ścieków [mg/dm^3]

Rys. 5.30. Bilans ładunków CSA w rzece
Fig. 5.30. Balance of load of QAS in river

$$Q_{rz} * 0 + Q_{ść} * S_{CSA} = (Q_{rz} + Q_{ść}) * S_{PEC} \qquad (5.3)$$

z tego

$$S_{PEC} = \frac{Q_{ść} * S_{CSA}}{Q_{rz} + Q_{ść}} \text{ mg/ dm}^3 \qquad (5.4)$$

Do obliczeń wzięto dane:

Średni niski przepływ Kłodnicy z lat 1954-2000 występujący z 90% prawdopodobieństwem [168,169], SNQ = 3,33 m^3/s.

Przepływ ścieków z Centralnej Oczyszczalni w Gliwicach $Q_{ść}$ = 51000 m^3/d = 0,59 m^3/s.

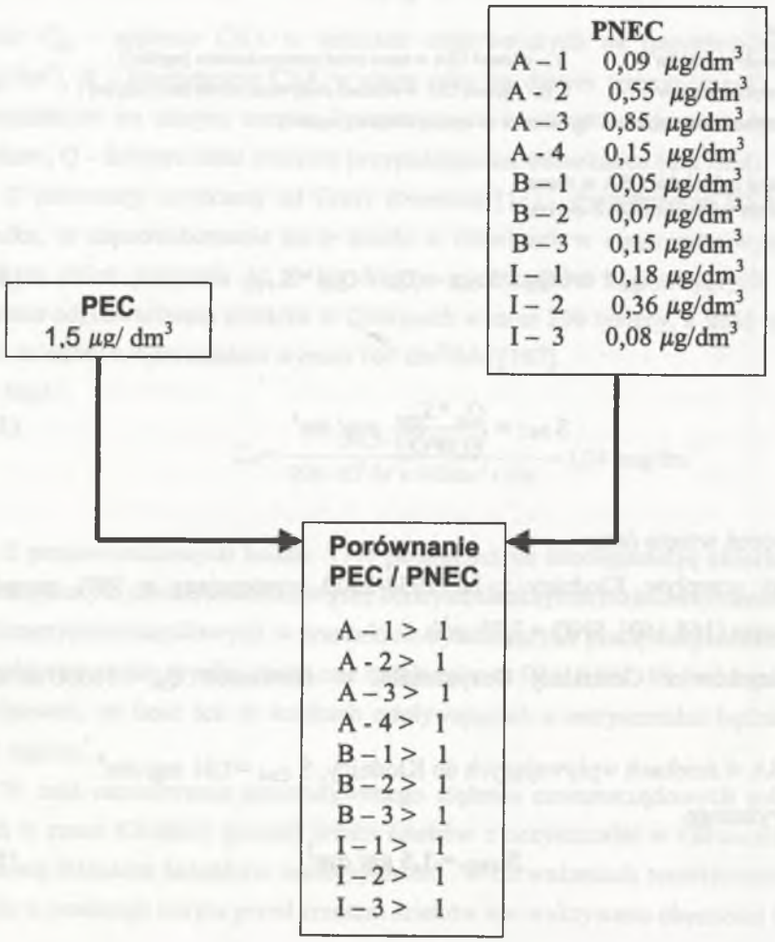
Stężenie CSA w ściekach wpływających do Kłodnicy, S_{CSA} =0,01 mg/dm^3.

Wobec powyższego

$$\mathbf{S_{PEC} = 1{,}5\ \mu g/\ dm^3} \qquad (5.5)$$

Obliczanie stężenia, przy którym w wodzie nie oczekuje się żadnych negatywnych oddziaływań badanych substancji na organizmy żywe

Do wyliczenia tego stężenia wykorzystuje się najmniejszą wartość $LC(EC)(IC)_{50}$ uzyskaną z badań ostrej toksyczności dla każdego związku (tabela 5.6a–5.6e), którą się dzieli przez współczynnik bezpieczeństwa 100 [165]. Ponieważ iloraz PEC/PNEC jest większy od jedności (rys.5.31), to substancje te stanowią potencjalne zagrożenie dla środowiska wodnego.



Rys. 5.31. Ocena ryzyka dla środowiska wodnego, związanego ze stosowania chlorków: (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowych, benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych i imidazoliowych

Fig. 5.31. Assessment of risk connected with application of l(alkoxymethyl)alkydimethylammonium, benzyl(alkoxymethyl)dimethylammonium and imidazolium chlorides

5.4.2. Oszacowanie ryzyka według Bartza

Ocenę przeprowadzono dla chlorków: (alkoksymetylo)alkilodimetylo-amoniowych, benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych i imidazoliowych w oparciu o klasyfikację zagrożeń wodnych związkami chemicznymi, zamieszczoną w Niemieckiej Ustawie Ochraniającej Wody [4]. Do wyliczenia liczby ryzyka wodnego wykorzystano wyniki badań toksyczności wykonanych na rybach i bakteriach (tabela 5.6a-5.6e) oraz na ssakach (dane literaturowe).

Liczba ryzyka wodnego $$WGZ = \frac{Z_a + Z_b + Z_c}{3} \quad (5.6)$$

Uzyskane wyniki toksyczności LC_{50} dla ryb *Lebistes reticulatus* dla wszystkich badanych chlorków mieściły się w zakresie 1-100 mg/dm^3 (tabela 5.6 a-5.6e), wobec czego wartość Z_b będzie w zakresie 4-5,9 (tabela 2.2). Dla bakterii *Vibrio fischeri* wartości EC_{50} dla wszystkich badanych związków z wyjątkiem A-2 są poniżej 1 mg/dm^3 (tabela 5.6a-5.6.e), dlatego też przyjmuje się wartość Z_c jako 6 (tabela 2.2). Ponieważ z danych literaturowych wynika [151-153], że wyznaczone w badaniach na szczurach LD_{50} dla badanych chlorków było w zakresie 281 – 1450 mg/dm^3, więc można im przypisać cyfrę Z_a=3.

Wobec powyższego $$WGZ = \frac{3+6+4}{3} = 4{,}3 \quad \text{lub} \quad WGZ = \frac{3+6+5{,}9}{3} = 4{,}96 \quad (5.7)$$

Liczby te są przyporządkowane współczynnikowi ryzyka wodnego WGK 2. Wykazano [79], że badane związki nie są wysoko podatne na biodegradację według wytycznej OECD 301E [166] (to znaczy, że w procesie prowadzonym przez nieliczne, nie zaadaptowane do ich rozkładu mikroorganizmy, nie są rozkładane więcej niż 70%). Ulegają jednak biodegradacji w teście potwierdzającym według wytycznej OECD 303A [76-79] i teście „rzecznym", prowadzonym przez mikroorganizmy zaadaptowane do rozkładu tych związków (tab.5.20). Zatem nie zastosowano zaostrzenia kryterium i współczynnik ryzyka wodnego ustalono na poziomie WGK=2. Otrzymany współczynnik ryzyka wodnego WGK 2 (tabela 2.3) wskazuje, że badane czwartorzędowe sole amoniowe są zagrożeniem dla wód.

Ze względu na istniejące zagrożenie ekosystemu wodnego czwartorzędowymi solami amoniowymi wskazane było wyznaczenie ich bezpiecznych stężeń dla wód powierzchniowych.

5.4.3. Wyznaczanie bezpiecznych stężeń czwartorzędowych chlorków amoniowych w wodach powierzchniowych

Ponieważ brak jest możliwości prowadzenia badań dla wszystkich przedstawicieli poziomów troficznych w ekosystemach, zastosowano ekstrapolację danych z testowych badań laboratoryjnych na biocenozę zasiedlającą ekosystemy wodne. Ekstrapolacja została wprowadzona celem wyznaczenia stężeń bezpiecznych badanych związków dla środowiska wodnego. Wśród metod ekstrapolacji najliczniejszą grupę stanowią empiryczne modele statystyczne, które określają nam wpływ toksykanta na gatunki nie poddawane testom, z bazy danych toksyczności uzyskanej dla innych gatunków organizmów [137].

Do wyznaczenia stężeń bezpiecznych czwartorzędowych chlorków amoniowych dla ekosystemu wodnego zastosowano ekstrapolację wyników LC_{50},EC_{50},IC_{50} przedstawionych w tabelach 5.6a-5.6e według empirycznego modelu statystycznego [273]. W metodzie tej danymi wyjściowymi do obliczeń stężeń bezpiecznych są wartości ln(LC/EC/IC_{50}). Metoda ma tę przewagę nad dotychczas stosowanymi, że opuszczając w niej założenie o normalności czy logistyczności rozkładu rozszerza przedział, w którym powinny się znaleźć wartości $LC(EC)_{50}$ dla 1-δ frakcji gatunków. Zakładano jak najmniej o postaci rozkładu tych wartości pośród gatunków żyjących w środowisku. Założono tylko, że dla danego rozkładu istnieje wartość przeciętna x i wariancja S^2 (w praktyce zawsze jest to spełnione).

Do obliczeń zastosowano nierówność Czebyszewa [171], która zakłada, że dla każdej dodatniej liczby rzeczywistej k zachodzi,

$k \geq 1$

$$P(|x - \bar{x}| \geq k \cdot S) \leq \frac{1}{k^2} \qquad (5.8)$$

gdzie: S - odchylenie standardowe zmiennej x, $\bar{x}$ - średnia arytmetyczna,

więc

$$P(|\ln(LC/EC/IC_{50}) - \bar{x}| \geq k \cdot S) \leq \frac{1}{k^2} \qquad (5.9)$$

przekształcając

$$P(\ln(LC/EC/IC_{50}) \leq \bar{x} - k \cdot S) \leq \frac{1}{k^2} \qquad (5.10)$$

przyjmując, $k = \frac{1}{\sqrt{\delta}}$, $0 < \delta < 1$

otrzymamy

$$P(\ln(LC/EC/IC_{50}) \leq \bar{x} - \frac{S}{\sqrt{\delta}}) \leq \delta \qquad (5.11)$$

tzn. prawdopodobieństwo przyjęcia przez zmienną losową ln(LC/EC/IC_{50}) wartości mniejszej od $\bar{x} - \frac{S}{\sqrt{\delta}}$ nie przekracza δ. Jeżeli znane są x i S i wybrane zostanie δ, to można zdefiniować liczbę $\ln C_\delta$ (logarytmiczne stężenie niebezpieczne dla δ frakcji gatunków) jako:

$$\ln C_\delta = \bar{x} - \frac{S}{\sqrt{\delta}} \qquad (5.12)$$

Jako nieznane parametry x i S przyjęto ich estymatory próbkowe, tj. odpowiednio średnią z próby i próbkowe odchylenie standardowe S_m.

Przekształcając równanie otrzymano:

$$C_\delta = exp(\bar{x}_m - k \cdot S_m) \qquad (5.13)$$

gdzie

$$k = \frac{1}{\sqrt{\delta}}$$

x_i - ln (LC/EC/IC50) i-tego gatunku,

$\bar{x}_m$ - średnia arytmetyczna x_i,

S_m - próbkowe odchylenie standardowe x_i,

C_δ - stężenie niebezpieczne dla δ frakcji gatunków,

δ - frakcja gatunków w środowisku, których LC/EC/IC50 może być niższe od C_δ; przyjęto $\delta = 0{,}05$.

Tabela 5.21

Wartości stężeń bezpiecznych badanych chlorków dla ekosystemu wodnego metodą ekstrapolacji dla 95% gatunków chronionych

Chlorki	$x_{śr}$ z ln EC_{50} lub IC_{50} lub LC_{50}	S_m	$\ln(C_\delta)$	C_δ [$\mu g/dm^3$]
A-1	- 1,912	1,857	- 10,221	0,036
A-2	- 0,500	1,380	- 6,672	1,2
A-3	- 0,832	1,022	- 5,403	4,5
A-4	- 1,468	1,720	- 9,163	0,1
B-1	- 0,911	3,728	- 17,582	$2,3 \cdot 10^{-5}$
B-2	- 1,287	2,837	- 13,976	$8,5 \cdot 10^{-4}$
B-3	- 1,425	1,940	- 10,101	$4,1 \cdot 10^{-2}$
I-1	- 1,210	2,291	- 11,457	$1,06 \cdot 10^{-2}$
I-2	- 1,420	1,989	- 10,318	$3,3 \cdot 10^{-2}$
I-3	- 1,593	2,249	- 11,655	$8,7 \cdot 10^{-3}$

Stosując test Shapiro-Wilka [61] na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, wykazano, że rozkład zmiennych $\ln(LC_{50}, EC_{50}, IC_{50})$ dla wszystkich badanych związków nie jest ani normalny, ani logistyczny.

Najniższe wartości stężeń bezpiecznych uzyskano dla chlorków benzylo-(alkoksymetylo)dimetyloamoniowych, co czyni je najbardziej niebezpieczne dla środowiska wodnego wśród badanych grup (tab.5.21). Również w oddziaływaniu na roślinność glebową właśnie te preparaty były najbardziej fitotoksyczne. Ponieważ wykazano również, że chlorki (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowe są bardziej przydatne jako środki grzybobójcze [232], w związku z tym chlorki benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowe powinny być wykluczone z możliwości wprowadzenia do obrotu handlowego, tym bardziej że w Europie Zachodniej zaznacza się spadek zużycia tego typu związków [6].

Wyznaczone stężenia (z wyjątkiem preparatu A-3) są od 5 do 1000 razy niższe od tych, które wykryto w rzekach Francji i Holandii [199,254], oraz od przewidywanego stężenia, które może się pojawić w rzece Kłodnicy. Przypuszcza się więc, że ze wszystkich przebadanych związków jedynie preparat A-3 (chlorek dodecylodimetylo(nonyloksymetylo)amoniowy) nie powinien powodować zagrożenia dla biocenozy wodnej. Należy zwrócić uwagę na fakt, że wyznaczone wartości stężeń

bezpiecznych według Załęskiej–Radziwiłł [273] różnią się od wartości PNEC oszacowanych za pomocą współczynników bezpieczeństwa. Metoda współczynników bezpieczeństwa jest metodą prostą, pozwalającą jedynie wstępnie oszacować ewentualne zagrożenie. Natomiast metody ekstrapolacji, biorące pod uwagę ilość gatunków zasiedlających środowisko, a także prawdopodobieństwo przeszacowania wartości stężenia bezpiecznego, pozwalają na uzyskiwanie bardziej wiarygodnych wyników. Z pewnością metody te nie są doskonałe, jednak pozwalają na ocenę zagrożeń środowiska i stwarzają możliwości przeciwdziałania zagrożeniom.

6. PODSUMOWANIE

Potencjalne zagrożenie wód naturalnych czwartorzędowymi solami amoniowymi (należącymi do kationowych związków powierzchniowo czynnych) wynika z powszechości ich występowania i różnorodnej możliwości przedostawania się do zbiorników wodnych wraz z opadami lub spływami obszarowymi, albo wskutek doprowadzenia ścieków. Z wprowadzonymi zanieczyszczeniami kontakt mają wszystkie żyjące w tym systemie organizmy, a także człowiek, który ujmuje te wody, wykorzystując je do picia. Ponieważ w naszym kraju nie monitoruje się obecności kationowych związków powierzchniowo czynnych ani w ściekach, ani w wodach powierzchniowych, a według Dyrektywy 76/464/EEC można je uznać za związki niebezpieczne, wydało się uzasadnione podjęcie badań oceny potencjalnego zagrożenia CSA środowiska wodnego.

W zakres prowadzonych badań wchodziły eksperymenty laboratoryjne, mające na celu określenie podatności na rozkład biologiczny w teście rzecznym wybranych grup CSA, określenie ich toksyczności na podstawowych organizmach wskaźnikowych ogniwa troficznego (glony, skorupiaki, ryby i bakterie) oraz wyznaczenie bezpiecznych stężeń badanych substancji dla biocenozy wodnej, dzięki zastosowaniu empirycznego modelu statystycznego.

Do badań wytypowano nową generację czwartorzędowych soli amoniowych, charakteryzujących się właściwościami aplikacyjnymi i różną strukturą molekuły. Były to chlorki: alkilo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowe, benzylo(alkoksymetylo)-dimetyloamoniowe, 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe.

Na podstawie wyników jednogatunkowych testów toksykologicznych ostrych wyznaczono wartości stężeń letalnych, inhibicyjnych i efektywnych $LC(IC)(EC)_{50}$ i opierając się na kryteriach Unii Europejskiej dokonano wstępnej oceny szkodliwości badanych związków dla bioindykatorów. Stwierdzono, że wszystkie badane czwartorzędowe chlorki amoniowe można zaliczyć do substancji silnie toksycznych, jednakże oddziaływanie poszczególnych związków było odmienne. Zastąpienie jednego łańcucha alkilowego grupą benzylową powodowało kilku- do kilkunasto-krotny wzrost toksyczności związku w zależności od badanego organizmu, natomiast

wzrost ilości węgli w łańcuchu obniżał właściwości toksyczne preparatów. Zamiana podstawnika heksylowego na cykloheksylowy nie miała znaczącego wpływu na oddziaływanie na organizmy wodne. Ponadto otrzymane wartości EC_{50} w teście na rozwielitkach dla badanych związków były prawie 50-krotnie wyższe, niż uzykano dla tego gatunku w wyniku działania kationowych surfaktantów używanych przez firmę Lonza z USA w środkach ochrony drewna. W związku z tym badane preparaty można uznać za bezpieczniejsze dla środowiska od aktualnie stosowanych.

Badania wykazały również zmienne oddziaływanie CSA na poszczególne organizmy – przedstawicieli łańcucha pokarmowego ekosystemu. Najmniej wrażliwe w stosunku do tych związków były ryby. Natomiast najbardziej wrażliwe ogniwo w łańcuchu troficznym stanowili producenci (glony *Selenastrum capricornutum*). Statystyczna ocena istotności różnic wartości IC_{50} dla tych glonów z zastosowaniem testu t-Studenta (poziom ufności 95%) wykazała, że różnice pomiędzy tymi wartościami są większe niż wynikające z błędu analizy. Zatem przebadane związki można ułożyć w szereg malejącej toksyczności w stosunku do glonów *Selenastrum capricornutum* jak poniżej:

B – 1, B – 2 i I – 3 > A – 1 > B – 3 i A – 4 > I – 1 > I – 2 > A – 2 > A – 3

Ze względu na to, że są to organizmy najniższego poziomu troficznego, w sytuacjach awaryjnych, w wyniku przekroczenia stężeń bezpiecznych CSA, może dojść do eliminacji pewnych gatunków istotnych dla poszczególnych ogniw łańcucha troficznego. Z tego względu należałoby monitorować te związki w odpływach z oczyszczalni ścieków. Porównanie toksycznych efektów badanych związków w oparciu o biotesty z wykorzystaniem różnych organizmów wykazały słabą lub brak korelacji przy porównaniach pomiędzy testami. Sugerują one, że badania toksyczności w odniesieniu do CSA prowadzone powinny być z użyciem przedstawicieli wszystkich ogniw łańcucha pokarmowego.

Do badań włączono także rośliny, które należąc do grupy producentów w łańcuchu troficznym spełniają niebagatelną rolę w ekosystemie glebowym. W pracy wykazano, że badane związki oddziaływały w różnym stopniu na roślinę dwuliścienną *Sinapis alba* i jednoliścienną *Hordeum sativum*. *Sinapis alba* okazała się bardziej wrażliwa na działanie badanych chlorków niż jęczmień. Oddziaływanie chlorków amoniowych na rośliny uzależnione było nie tylko od przynależności gatunkowych testowanych organizmów, ale również od struktury badanych związków. Najmniej toksyczne dla roślin okazały się chlorki (alkoksymetylo)alkilodimetyloamoniowe. Natomiast obecność podstawnika benzenowego w cząsteczce związków powodowała

zwiększenie działania toksycznego chlorków amoniowych na korzeń i łodygę *Sinapis alba* oraz *Hordeum sativum*. Również obecność siarki w podstawniku alkilowym powodowała wzrost toksyczności związku. Ponieważ jednak wyznaczona wartość stężenia IC_{50} dla jęczmienia jest znacznie wyższa niż występującego w środowisku, więc badane związki mogą stanowić zagrożenie dla roślin uprawnych jedynie w przypadku katastrofy ekologicznej

Test rzeczny, podczas którego badano rozkład czwartorzędowych chlorków amoniowych z podstawnikiem alkoksymetylowym lub alkilometylowym, wykazał, że poszczególne preparaty zanikały w wodzie w różnym okresie czasu. Z wyliczonych stałych kinetycznych szybkości reakcji wynika, że najszybciej ulegają biochemicznemu rozkładowi chlorki alkilo- i benzylo- (alkoksymetylo)dimetylo amoniowe. Wyniki sugerują także, że wraz ze wzrostem ilości węgli w łańcuchu alkilowym szybkość biodegradacji maleje. Wyliczone stałe szybkości reakcji są znacznie wyższe od stałych podanych dla preparatów stosowanych w środkach zmiękczających przez firmę Procter & Gamble, co czyni badane substancje konkurencyjnymi w stosunku do powszechnie stosowanych zmiękczaczy. Wyniki testu pozwoliły na wyznaczenie dla poszczególnych substancji czasu półrozpadu, czyli 50% zaniku badanych związków w stosunku do stężenia początkowego. Czas połowicznego rozkładu wahał się od 0,5 do 1,6 doby w zależności od badanego związku. Otrzymane dane wskazują, że wszystkie badane preparaty są biologicznie rozkładalne w środowisku wodnym. Niezależnie od szybkości, mechanizm rozkładu śledzony przy wykorzystaniu analizy spektralnej ^{1}H NMR i ^{13}C NMR był taki sam. W pierwszym etapie biodegradacji badanych preparatów następował rozkład cząsteczki w miejscu przyłączenia łańcucha hydrofobowego do atomu azotu. Łączyło się to z utratą ich właściwości powierzchniowo czynnych. Powstająca równocześnie z rozkładem dimetyloamina ulegała dalszemu utlenieniu do azotu amonowego, który był wykorzystywany przez mikroorganizmy i wbudowany w biomasę jako substancja biogenna. Następnie, w wyniku mikrobiologicznej degradacji łańcucha alkilowego, powstawały pośrednie produkty utlenienia (alkohole), które w okresie prowadzenia badań nie ulegały dalszej biodegradacji. W przypadku obecności w cząsteczce pierścienia benzenowego, imidazoliowego lub cykloheksanu zachodziło zapewne utlenianie ich do ditlenku węgla i wody, gdyż w końcowym etapie badań biodegradacji nie stwierdzano obecności w roztworze pierścieni aromatycznych ani cyklicznych.

Wykorzystując wyniki badań z testów toksyczności oraz biodegradacji, oceniono ryzyko zagrożenia wód powierzchniowych czwartorzędowymi chlorkami amoniowymi z podstawnikiem alkoksymetylowym i alkilotiometylowym. Wykazano, że związki te stanowią zagrożenie dla wód. Dlatego też wyznaczono stężenia bezpieczne badanych związków dla biocenoz przy zastosowaniu empirycznego modelu statystycznego. W modelu tym zastosowano ekstrapolację danych z testowych badań laboratoryjnych na biocenozę zasiedlającą ekosystemy wodne. Najbardziej niebezpieczne wśród badanych grup dla środowiska wodnego, a także w oddziaływaniu na roślinność glebową były chlorki benzylo(alkoksymetylo)dimetylo amoniowe. Z tego powodu należałoby zmierzać do wyeliminowania tych związków już na etapie projektowania wyrobu i zastąpienia mniej szkodliwymi chlorkami alkilo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowymi i imidazoliowymi, tym bardziej że te dwie ostatnie grupy mają lepsze właściwości aplikacyjne, tj. zmiękczające, dezynfekcyjne, grzybobójcze i antystatyczne.

Testy toksyczności i genotoksyczności dla znajdujących się w roztworach wodnych pośrednich i końcowych produktów rozkładu badanych związków wykazały, że metabolity te nie posiadają właściwości toksycznych w stosunku do żadnego z organizmów testowych oraz również genotoksycznych dla człowieka. Znaczyłoby to, że nawet obecność tych związków w wodzie naturalnej i jej konsumpcja przez człowieka (w Polsce większość wód uzdatnianych dla celów pitnych pochodzi z wód powierzchniowych) nie spowoduje zagrożenia jego zdrowia w aspekcie możliwości oddziaływań kancerogennych.

Kierunki dalszych badań

1. Najwyższe dopuszczalne stężenia substancji lub pierwiastków toksycznych opracowywane są na podstawie testów na pojedynczych organizmach. Wyniki tych testów jednak nie informują o złożonych procesach zachodzących w ekosystemach, między innymi o migracji związków szkodliwych w łańcuchu pokarmowym, zmianach w strukturze i funkcjonowaniu biocenoz. W związku z tym uzyskane w pracy wyniki badań toksykologicznych będą stanowiły podstawę do dalszych badań w złożonych systemach – mezosystemach (mesocosms), prowadzonych na poziomie zespołów organizmów. Ogromną zaletą tego systemu jest prowadzenie badań na naturalnych zespołach organizmów wodnych, przy jednoczesnej możliwości introdukcji różnorodnych gatunków.
2. Planuje się rozszerzenie oceny zagrożenia środowiska czwartorzędowymi chlorkami amoniowymi do innego składnika biosfery – gleby.

3. Powszechność stosowania czwartorzędowych soli amoniowych przyczynia się do ich obecności w ściekach i osadach ściekowych. Konieczne więc będzie prowadzenie dalszych badań oceniających oddziaływanie tych związków na proces biologicznego oczyszczania ścieków i fermentacji metanowej osadów ściekowych, a także sprawdzenie ich persystencji w środowisku ściekowym.

7. WNIOSKI

1. Ocena ryzyka związanego z obecnością czwartorzędowych chlorków amoniowych z podstawnikiem alkoksy- i alkilotiometyloamoniowym w środowisku wodnym wykazała, że związki te stanowią zagrożenie dla wód. Wyznaczone stężenia bezpieczne (z wyjątkiem chlorku dodecylodimetylo(nonyloksymetylo)amoniowego) są znacznie niższe od szacowanej wartości występującej w środowisku, co powinno być uwzględnione przy normowaniu maksymalnych dopuszczalnych stężeń tych związków w wodach powierzchniowych.
2. Wykazano, że zarówno o szybkości rozkładu biologicznego, jak również o odmienności oddziaływania na biocenozę wodną i roślinność glebową decydowała struktura związku, a szczególnie takie jej elementy, jak: długość łańcuchów węglowodorowych, obecność pierścieni aromatycznych lub cyklicznych oraz atomów siarki bądź tlenu w podstawniku alkilowym.
3. Najbardziej niebezpieczne dla środowiska wodnego, a także w oddziaływaniu na roślinność glebową wśród badanych grup, były chlorki benzylo(alkoksymetylo)dimetyloamoniowe. Stwierdzono przy tym, że wydłużenie łańcucha alkilowego obniżało właściwości toksyczne preparatów.
4. Zróżnicowanie toksycznego oddziaływania na rośliny jednoliścienne i dwuliścienne wskazuje na możliwość wykorzystania analizowanych środków jako herbicydów.
5. Badane struktury z układem alifatycznym i heterocyklicznym wykazały odmienne działanie na przedstawicieli łańcucha pokarmowego ekosystemu wodnego. Najbardziej wrażliwe ogniwo w łańcuchu troficznym stanowili producenci (glony *Selenastrum capricornutum*). Przebadane związki można ułożyć w szereg malejącej toksyczności w stosunku do tych organizmów jak poniżej:

B – 1, B – 2 i I – 3 > A – 1 > B – 3 i A – 4 > I – 1 > I – 2 > A – 2 > A – 3

6. Udowodniono, że wszystkie preparaty są biologicznie rozkładalne w środowisku wodnym. Szybkość procesu determinowana była strukturą chemiczną badanych chlorków. Wzrost ilości węgli w łańcuchu alifatycznym, jak również zastąpienie jednego łańcucha alkilowego cykloheksanem zmniejszało szybkość biodegradacji.
7. Najszybciej degradowane były chlorki: benzylodimetylo(decyloksymetylo)- i dodecylodimetylo(oktyloksymetylo)amoniowy. Wyliczone stałe szybkości reakcji dla tych chlorków są znacznie wyższe od uzyskanych dla preparatów stosowanych w środkach zmiękczających przez firmę Procter & Gamble Company.
8. Wykorzystanie w badaniach biodegradacji magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwiło przedstawienie mechanizmu biologicznego rozkładu badanych grup chlorków oraz zidentyfikowanie powstałych metabolitów.
9. Przeprowadzone testy genotoksyczności nie wykazały genotoksycznego działania samych preparatów w stężeniach, w których występują w wodach naturalnych, ani też ich produktów biologicznego rozkładu.
10. Spośród przebadanych czwartorzędowych soli amoniowych, chlorek dodecylodimetylo(nonyloksymetylo)amoniowy można uznać za związek stwarzający najmniejsze ryzyko dla środowiska. Otrzymane wartości w testach toksyczności oraz wyznaczony czas połowicznego zaniku w środowisku wodnym dla tego chlorku czynią go konkurencyjnym względem preparatów znajdujących się w obrocie handlowym.
11. Uzyskane w badaniach dane stanowią cenne wskazówki dla producentów tej grupy związków w tworzeniu preparatów użytecznych, a zarazem jak najbardziej bezpiecznych dla środowiska. Mogą stanowić narzędzie selekcji i wycofywania już stosowanych produktów oraz dawać impuls do poszukiwania nowych związków o mniejszym stopniu ryzyka.

LITERATURA

1. Antychowicz J.: Przeżywalność w środowisku wodnym wirusów wywołujących choroby ryb oraz ich zwalczanie. „Medycyna Weterynaryjna" 2002, t.58, (2), s. 99-102.
2. Baleux B., Caumette P.: Biodegradation de quelques agents de surface cationiques. "Water Research" 1976, vol.11, p. 833-841.
3. Bahadur P., Chand M.: Studiem on dodecyl ammonium chloride in the presence of additives. "Tenside Detergents". 1997, vol.34, (5), p. 347-356.
4. Bartz W.J.: Lubricants and the environment. "Tribology International" 1998, vol.31, (1-3), p. 35-47.
5. Becker H.: Neue Holzschutzmitt – Gruppe: Alkylamoniumverbindungen. „Seifen-Öle-Fette-Wachse" 1984, vol.110, (1), p. 15-17.
6. Białowąs E., Hreczuk W., Szymanowski J.: Zaplecze surowcowe, produkcja i zastosowanie związków powierzchniowo czynnych na progu nowego milenium. „Przemysł Chemiczny" 2001, t. 80, nr 10 s. 449-453.
7. Blum D.J., Speece R.E.: Determining chemical toxicity to aquatic species. The use of QSAR and surrogate organisms. "Environmental Science Technology" 1990, vol.24, (3), p. 284-293.
8. Bluzot R., Seuge J.: Effect á long terme de quatre détersifs chez le pulmoné d'eau douce Lymnea stagnalis L, intoxication des animaux dés l'éclasion. "Environmental Pollution" 1981, z.25, (2), p. 105-111.
9. Boethling R.S.: Environmental aspects of cationic surfactants, [in:] "Cationic Surfactants. Analytical and Biological Evaluation". Cross J., Singer E.J., Eds., t.53. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel 1994.
10. Bożko L., Rzechowska E.: Metody określenia biodegradacji substancji powierzchniowo czynnych. "Postępy Mikrobiologii" 1973, t.13, nr 2, s.189-193.
11. Bragadin M., Dellantone P.: Mitochondrial Bioenergetics as Affected by Cationic Detergents. "Archives of Environmental Contamination and Toxicology" 1996, vol.30, (2), p. 280-284.

12. Breen D.: Supercritical fluid extraction and off-line HPLC analysis of cationic surfactants from dried sewage sludge. "Water Research" 1996, vol.30, (2), p. 476-480.
13. Brenntag Polska sp. z o.o.: Dystrybutor czwartorzędowych soli amoniowych, Kędzierzyn. Informacja ustna. 2002.
14. Brock M.: Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Wäscheweichspüler. „Tenside Detergents" 1993, vol. 30, (6), p. 394-399.
15. Brycki B.: Aktywność biologiczna czwartorzędowych soli amoniowych. Mat. II Symp. "Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1996, s. 24-36.
16. Brycki B., Skrzypczak A., Mirska I., Pernak J.: Synthesis and Antimicrobial Activity of New Quaternary Ammonium Chlorides. „Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem." 1996, vol.329, p. 279-282.
17. Brycki B.: Aktywność przeciwdrobnoustrojowa oraz inne własności aplikacyjne czwartorzędowych soli amoniowych. Mat. III Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1997, s. 89-102.
18. Brycki B.: Czwartorzędowe sole amoniowe jako środki ochrony drewna. Mat. IV Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań, 1998, s. 83-98.
19. Butcher J.A., Preston A.P., Drysdale J.: Initial screening trials of same quaternary ammonium compounds and amine salts as wood preservative. „For. Prod. J." 1977,vol.27, (7), p. 19-22.
20. Butcher J.A., Drysdale J.: Relative tolerance of seven wood-destroying Basidiomyc etes to quaternary ammonium compounds and copper-chrome-arsenate preservatives. „Material und Organismen" 1977, vol.12, (4), p. 271-277.
21. Cairns R.R.: Effects of surfactants applied to samples of solonetz soil on water penetration and plant growth. „Canadian Journal of Soil Science" 1972, vol.52, p. 267-269.
22. Council Directive 76/464/EEC of 4 may 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the community. European Community Environment Legislation. V.7, Water, pp.57-58.
23. Council Directive 82/243/EEC on the approximation of the laws of Member States relating to methods of testing the biodegradability of anionic surfactant and amending directive 73/405/EEC-O.J.22.04.82 No/109/18.

24. Council Directive 82/242/EEC on the approximation of the laws of Member States relating to methods of testing the biodegradability of nonionic surfactant and amending directive 73/404/EEC-O.J.22.04.82 No/109/21.
25. Cross J.: Introduction to Cationic Surfactants, [in:]: „Cationic Surfactants. Analytical and Biological Evaluation." (Marcel Dekker, Eds), Inc., New York-Basel, Hong Kong 1994.
26. Czeczot H., Rahden-Staroń I.: Wybrane krótkoterminowe testy bakteryjne i na organizmach eukariotycznych, stosowane do oceny genotoksyczności środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych. „Roczniki PZH" 1997, t.48, s. 317-336.
27. Czeczot H., Skrzynki M., Podsiad M.: Ocena właściwości genotoksycznych Stymulenu in vitro. „Roczniki PZH" 2003, t.54, s. 80-82.
28. Davis B.: Industrial Applications of Surfactants, Karsa D.R. (Eds.), Royal Society of Chemistry, London 1987.
29. Diz M., Jocić D., Infante M., Erra P.: Reaction of new thiol cationic surfactant with keratin bune salt. World Surfactant Congress 4th , Barcelona, 3-7.06.1996.
30. Dobozy O.K., Bartha B.: Non–pollutant surfactants stimulating the growth of plants. "Tenside Detergents" 1976, vol.13, (3), p. 139-144.
31. Dojlido J.: Metody pomiaru biodegradacji. "Nowa Technika w Inżynierii Sanitarnej. Wod.i Kanal." 1982, z.15, s. 39-90.
32. Dojlido J.: Chemia wód powierzchniowych. Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 1995.
33. Domagk G.: Dtsch. Med.Wochenschr. 1935, t.61,s.829-832; cyt. za Pernak J.: Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides. „Eur. J. Med. Chem." 2001, vol.36, p. 313-320.
34. Doyle K., Ruddick J.: The microdistribution of alkylammonium compounds in Ponderosa Pine Sapwood. „Holzforschung" 1994, vol.48, (2), p. 106-112.
35. Drobeck H.P.: Current Topics on the Toxicity of Cationic Surfactants, [in:] Cationic Surfactants. Analytical and Biological Evaluation. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel Hongkong 1994.
36. Dyrektywa Rady Wspólnoty Europejskiej 92/32/EEC, 30 April 1992.
37. ECETOC 1993: *Environmental hazard assessment of substances*, Europen Chemical Industry and Toxicology Centre (ECETOC), Brussels, Belgium, Technical report no. 51;cyt. za: Van Wijk R.J. et al., Proc. 4 th World Surfactants Congress, Barcelona, 1996, vol.3, p.143-154.

38. Eckenfelder W.W., Grau P.: Activated sludge process design and control – theory and practice. Praca zbiorowa pod red. Eckenfelder W.W., Malina J.F., Patterson J.W., (Eds) Inc, Lancaster – Basel 1992.
39. EEC. 1993: Technical guidance document in support of the risk assessment directive (93/67/EEC) for substances notifited in accordance with the requirements of Council Directive 67/548/EEC,Brussels; cyt. za: Van Wijk R.J. et al., Proc. 4 th World Surfactants Congress, Barcelona, 1996, vol.3, p.143-154.
40. EEC. 1993: Commission Regulation laying down the priciples for the assessment of risks to man and the environment of existing substances in accordance with Council Regulation (EEC) No 793/93/EEC. Doc.XI/774/93 Rev.2, Brussels; cyt. za: Van Wijk R.J. et al., Proc. 4 th World Surfactants Congress, Barcelona, 1996, vol.3, p.143-154.
41. Ernst R., Arditti J., Healey P.L.: Biological effect of surfactants. I. Influence on the growth of orchid seedlings. „New Phytol." 1971, vol. 70, p.457-475.
42. Espoito A., Falorni M., Taddei M.: Synthesis of amphiphilic polydroxylated pyrrolidines as potential glycosidase inhibitors. „Tetrahedron Letters" 1998, vol. 39, p.6543-6546.
43. Farrel A.P., Kennedy C.J., Wood A.: Acute toxicity a didecylodimethyl-ammonium chloride-based wood preservative, Bardac 2280, to aquatic species. „Environmental Toxicology and Chemistry" 1998, vol.17, (8), p.1552-1557.
44. Fenger B.H., Mandrup M., Rohde G., Sorensen K.: Degradation of cationic surfactants in activated sludge pilot plants. "Water Res." 1973, vol.7, p.1195-1208.
45. Filipowicz B., Więckowski W.: Biochemia. PWN, Warszawa-Łódź 1983.
46. Fischer W.K.: Die prăfung von chemikalien auf toxizităt gegenărber kleinkrebsen (Daphnia magna). ,"Vom Wasser" 1977,vol. 38, p.247-254.
47. Fojutowski A.: Wartość grzybobójcza i wymywalność chlorku alkilodimetylo-amoniowego w metodzie agarowo-klockowej. Mat. III Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1997, s.103-113.
48. Fojutowski A.: Przeciwsiniznowe działanie mieszanin na bazie QAC, IPBC i propikonazolu. [w:] "Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania", Instytut Technologii Drewna 2001, s.253-257.

49. Fojutowski A., Kropacz A.: Działanie wybranych chlorków pirydyniowych na powodujący siniznę drewna grzyb *Sclerophoma pitryophila*. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania", Instytut Technologii Drewna 2001, s.258-262.
50. Fojutowski A., Zabielska-Matejuk J.: Ochrona tarcicy iglastej przed sinizną czwartorzędowych soli amoniowych w preparacie Fungosept'93. [w:] "Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania", Instytut Technologii Drewna 2001, s.263-266.
51. Franklin T.J., Snow G.A.: Biochemistry of Antimicrobial Action.4th Edition, Chapman and Hall, London 1989.
52. Friedman: Biochemistry, Little, Brown and Co., USA 1992.
53. Games L.M., King J.E., Larson R.J.: Fate and distribution of a quaternary ammonium surfactant,octadecyltrimethylammonium chloride in wasterwater tretment. „Environmental Science and Technology" 1982, vol.16, p.483-488.
54. Garcia M.T., Ribosa I., Sanchez-Leal J: Effect of hydrophobic moiety of quaternary ammonium based surfactants on their ecological propertie, 4 th World Surfactant Congress, Barcelona 1996, p.373-377.
55. Garcia M.T., Ribosa I., Sanchez-Leal J., Hreczuch W.: Effect of homolog distribution on the toxicity of alcohol ethoxylates. „JAOCS" 1996, vol.73,(7), p.903-906.
56. Garcia M.T., Ribosa I., Guindulain T., Sanchez–Leal J., Vives-Rego J.: Fate and effect monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. „Environmental Pollution" 2001, vol.111, p.169-175.
57. Gerike P.: Surfactant quaternary ammonium salts anaerobic sewage digestion. „Water Res." 1978, vol.12, p.1117-1122.
58. Gerike P.: Uber den biologischen Abbau und die Bioelimination von kationischen Tensiden. „Tenside Detergents" 1982, vol.19, p.162-164.
59. Giolando S. i in.: Environmental fate and effects of DEEDMAC: a new rapidly biodegradable cationic surfactant for use in fabric softeners. „Chemosphere" 1995, vol. 30, (6), p.1067-1083.
60. Gloxhuber Ch.: Toxical propertis of surfactants. „Arch. Toxicol." 1974, vol.32, p.245-270.
61. Gondko R., Zgirski A., Adamska M.: Biostatystyka w zadaniach. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1994.
62. Gorczyński T.: Rośliny użyteczne. Wiedza Powszechna, Warszawa 1966.

63. Grabińska-Sota E., Zdybiewska M.: Ocena metod stosowanych przy biodegradacji na przykładzie wybranych kationowych substancji powierzchniowo czynnych. "Gaz, Woda i Technika Sanitarna" 1984, t.58, nr 3, s.60-63.
64. Grabińska-Sota E.: Zagrożenie środowiska ze strony SPC. „Chemik" 1990, nr 11, s.279-281.
65. Grabińska-Sota E., Janosz-Rajczyk M., Bienia M.: Ocena toksyczności dipolioksyetylenoalkiloamin i pośrednich produktów biodegradacji tych substancji. "Biotechnologia" 1994, t. 25, nr 2, s.75-86.
66. Grabińska-Sota E.: Biologiczny rozkład chlorków n-alkilotiometylo pirydyniowych. "Chemik" 1995,t.48, nr 4, s.108-111.
67. Grabińska-Sota E., Janosz–Rajczyk M., Stuchlik B.: Badanie toksyczności chlorków imidazoliowych i produktów powstałych w wyniku biologicznego rozkładu. Mat. XV Sympozjum PK IAWQ. "Badania toksykologiczne w ochronie wód", Warszawa 1995, s.147-164.
68. Grabińska-Sota E., Janosz-Rajczyk M.: Evaluation of the toxicity of imidazolium chlorides and the products formed as result of biological decay. Environmental Biotechnology'96 Conf., Palmerston North, New Zeland 1996, Vol. 1, p.699-705.
69. Grabińska-Sota E., Kalka J.: Ocena toksyczności chlorków pirydyniowych oraz ich metabolitów pobiodegradacyjnych. Mat. V Symp. Nauk.-Tech. „Biotechnologia Środowiskowa" 1997, cz. II, s.143-152.
70. Grabińska-Sota E., Kalka J.: Biodegradacja związków polepszających właściwości zwilżające herbicydów. "Pestycydy" 1997, z.3/4, s.93-99.
71. Grabińska-Sota E.: Śledzenie procesu biologicznego rozkładu kationowych SPC przy wykorzystywaniu magnetycznego rezonansu jądrowego i metod analitycznych. Mat. IV Międzynarodowego Symp. „Forum Chemiczne 98", Warszawa 1998, s.90.
72. Grabińska-Sota E.: Śledzenie procesu biologicznego rozkładu chlorków imidazoliowych w ekosystemie wodnym. Mat. IV Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1998, s.103.
73. Grabińska-Sota E., Janosz-Rajczyk M.: Evaluation of the toxicity of imidazolium chlorides and the products formed as a result of biological decay. „Inżynieria i Ochrona Środowiska" 1998, (1), p.15-24.

74. Grabińska-Sota E., Kalka J.: Ocena glonobójczego działania wybranych KSPC. [w:] „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka". Pr. zbior. pod red. M. Janosz-Rajczyk, Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 1999, s.103-107.
75. Grabińska-Sota E.: Próba oceny toksyczności KSPC obecnych w wodach według kryterium UE. [w:] „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka". Pr. zbior. pod red. M. Janosz-Rajczyk, Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2000, s.56-59.
76. Grabińska-Sota E., Jurkiewicz S.: Przebieg i skuteczność usuwania wybranych kationowych związków powierzchniowo czynnych ze ścieków metodą osadu czynnego. Mat. Krajowej Konf. Nauk. „Surfaktanty i układy zdyspergowane", Wrocław 2000, s.261-264.
77. Grabińska-Sota E.: Podatność na biodegradację chlorków alkilometyloamoniowych. Raport z realizacji projektu badawczego. Symbol rejestracyjny Uczelni BW-513/RIE-8/2000.
78. Grabińska-Sota E., Jurkiewicz S.: Badanie biodegradacji antyelektrostatyków. Mat. VII Międzynarodowego Symp. „Forum Chemiczne", Warszawa 2001, s.150.
79. Grabińska-Sota E.: Czwartorzędowe sole amoniowe - ocena oddziaływania na środowisko. [w:] "Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.105-116.
80. Grabińska-Sota E., Kalka J.: Określenie toksyczności chlorków imidazoliowych w stosunku do biocenozy wodnej. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.276-279.
81. Grabińska-Sota E., Kalka J.: Badanie wpływu związków (alkaksymetylo)benzylodimetyloamoniowych na wzrost roślin dwuliściennych. [w:] "Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.272-275.
82. Grabińska-Sota E., Witecy D.: Toxic influence on plants growth of new wood preservatives, Secotox World Congress and Sith Europen Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, Kraków 2001, p.176-179.
83. Grabińska-Sota E., Kalka J.: An assessment of toxicity of pyridinium chlorides and their biodegradation intermediates. Secotox World Congress and Sith Europen Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, Kraków 2001, p.166-169.

84. Grabińska-Sota E., Wiśniowska E.: Ocena mutagennego działania wybranych czwartorzędowych soli amoniowych. „Bromatologia, Chem.Toksykologiczna" 2001,t. 34, z. 2, s.175-179.
85. Grabińska-Sota E., Witecy D.: Toxic influence of new wood preservatives on plants growth. „Archiwum Ochrony Środowiska" 2002,vol. 28, (4), p. 27-32.
86. Grabińska-Sota E., Wiśniowska E.: Genetoxicological effects of selected methylammonium chlorides on Bacillus subtilis, „CHISA 2002", Praga 2002, Summaries 5, p.196.
87. Grabińska-Sota E., Kalka J.: Biodegradation of 1-decyl-3-cykloheksyloxymethylimidazolium chloride and genotoxicity of biodegradation intermediates. SETAC Europe 12th Annual Meeting; „Challenges in Environmental Risk Assessment and Modelling", Vienna 2002, p.93.
88. Grabińska-Sota E.: Influence of new fungicides on soil vegetation. Przyjęte do druku w „Polish Journal of Environmental Studies" 2004.
89. Grabińska-Sota E., Kalka J.: An assessment of toxicity of pyridinium chlorides and their biodegradation intermediates. „Environmental International" 2003, vol.28, p.687-690.
90. Gregáň F., Oremusová J. i in.: Steroisomeric effect on antimicrobial activity of a series of quaternary ammonium salts. „IL Farmaco" 1998,vol. 53, p.41-48.
91. Gull W., Gode P.: Correlation between Lethal and Chronic/Biocenotic Effect Concentration of Surfactants. „Tenside Detergents" 1989, vol.26, p. 282- 287.
92. Hellmann H.: Einsatz der IR Spektroskopie beim Abbau organischer Stoffe. III. Mitteilung: Kationtenside. „Z. Wasser Abwasser Forsch." 1983, vol.16, p.174 – 177.
93. Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziorowski B.: Fizyczno-chemiczne badania wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1999.
94. Hoffmann F., Cinatl J., Kreuter J.: Preparation, characterization and cytoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. „International Journal of Pharmaceutics" 1997, vol. 157, p. 189-198.
95. Horwitz M., Givelberg A.: Toxic effect surfactants aslied to plants roots. „Pestic.Sci." 1979, vol.10, p.547-557.
96. Huber L.H.: Ecological behavior of cationic surfactants from fabric in the aquatic environment. „ JAOCS'' 1984,vol. 61, (2), p. 377-382.

97. Hulme M.A., Thomas J.P.: Control of fungal sap stain with alkaline solutions of quaternary ammonium compounds and with tertiary amine salts. „For. Prod. J." 1979, vol.29, (11), p.26-29.
98. Ikeda T., Tazuke S.: Biocidal polycations. „Polym. Prepr." 1985, vol.26, p.226-227.
99. Issa A.A.: Effect of detergent on River Nile water microflora. „Acta Hydrobiol." 1995, vol. 37, (2), p.93-102.
100. ISO/140000, 1996. Environment Management Systems.
101. Itoh S., Naito S.: Studies on the biodegradation test method of chemical substances. "Yukagaku" 1982, vol.31, p.277-280 cyt. za Karsa D.R.: Biodegradability of Surfactants. Blackie Academic and Professional, Glasgow 1995.
102. Janosz-Rajczyk M.: Możliwości stosowania kationowo-aktywnych substancji powierzchniowo czynnych do zwalczania obrostów biologicznych. Prace Inst.Tech.Org. i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1981, nr 11, s.50.
103. Janosz-Rajczyk M., Jurkiewicz S., Szeja W.: Próby określenia substancji hamujących utlenienie wybranych kationowych substancji powierzchniowo czynnych w procesie ich biodegradacji. Materiały XXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Katowice 1986.
104. Janosz-Rajczyk M.: Wykorzystanie techniki widmowej IR i ^{1}H NMR do badań biodegradacji trudno rozkładalnych substratów na przykładzie KSPC. „Archiwum Ochrony Środowiska" 1992, t.47, nr 3-4, s.47-56.
105. Janosz-Rajczyk M.: Biodegradation of alkyldipolyethoxybenzyl ammonium chloride. „Tenside Detergents'' 1992, vol.29, p.436-441.
106. Janosz-Rajczyk M.: Biodegradacja kationowych substancji powierzchniowo czynnych. Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 1994, ser. Inżynieria Środowiska z.37.
107. Janosz-Rajczyk M.: Opracowanie metodyki oznaczania biodegradacji SPC. Raport na zlecenie GIOŚ, Gliwice 1996.
108. Janosz-Rajczyk M., Grabińska-Sota E., Jurkiewicz S.: Biodegradacja całkowita wybranych dipolioksylenoalkiloamin. „Archiwum Ochrony Środowiska" 1997, vol.23, (3-4), p.105-123.
109. Kada T. i in.: Screening of environmental chemcal mutagens by the rec-assay system with Bacillus subtilis. [w:] Chemical Mutagens. Vol.6.Eds.: F.J. de Serres, Hollaender. Plenum Publishing Corp., New York 1980, p. 149-173.

110. Kaiser K.L.E., Palabrica V.S.: Photobacterium phosphoreum toxicity data index. „Water Pollut. Res.J.Can.'' 1991, vol.26, p.361-431.
111. Kala R., Woźniak B.: Ocena toksyczności metabolitów pobiodegradacyjnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) testem z Lemna minor. Mat. XVII Symp.-Aqua'97 „Problemy Inżynierii Środowiska", Płock 1997, s.29-36.
112. Kańska Z.: Zastosowanie metod biodegradacji w Biotechnologii Środowiskowej. Mat. IV Międzynarodowego Symp. „Forum Chemiczne 98", Warszawa 1998, s.65-68.
113. Karsa D.R., Porter M.R.: Biodegradability of Surfactants, Blackie Academic and Professional, Glasgow 1995.
114. Kawecka B., Pertti V.E.: Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych. PWN, Warszawa 1994.
115. Kędzia W., Muszyński Z., Mirska I., Nowak B.: Właściwości nowych amin tłuszczowych i ich pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych. Wyd. Akademii Medycznej, Poznań 1984.
116. Kiernicka J., Kołwzan B., Śliwka E.: Zastosowanie testu amesa do oceny potencjalnych właściwości mutagennych i rakotwórczych gleby. Mat. XVII Symp.- Aqua'97 „ Problemy Inżynierii Środowiska", Płock 1997, s.158-165.
117. Klimuk E., Lossow K., Bulińska M.: Kinetyka reakcji i modelowania reaktorów biochemicznych w procesach oczyszczania ścieków. Wydawnictwo ART, Olsztyn 1995.
118. Knauf W.: Bestimmung der Toxizitat von Tensiden bei Wasserorganizmen. „Tenside Detergents" 1973, vol.10, (5), p. 251-255.
119. Knezovich J.P., Lawton M.P., Inouye L.S.: Bioaccumulation and tissue distribution of a quaternary ammonium surfactant in three aquatic species. „Bull.Environ. Contam.Toxicol." 1989, vol. 42, p.459-467.
120. Knezovich J.P., Inouye L.S.: The influence of sediment and colloidl material on the bioavailability of a quaternary ammonium surfactant. „Ecotoxicology and Environmental Safety" 1993, vol.26, p.253-264.
121. Kooijman S.A.L.M.: A safety factor for LC_{50} values allowing for differences in sensitivity among species. „Wat. Res." 1987, vol.21, (3), p.269-276.
122. Kośmider S., Wieczorek M., Szymaniec J., Zieliński M., Michalska H.: Przewlekła toksyczność detergentów u szczurów. „Bromat.Chem.Toksykol." 1974, nr 3, s.375-382.

123. Krajewski K., Ważny J.: Zastosowanie CSA w budownictwie. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.79-94.
124. Kunieda H., Shinoda K.: Solution behavior of dialkyldimethylammonium chloride in water.Basic properties of antistatic fabric softeners. „The Journal of Physical Chemistry" 1978, vol. 82, p.1710-1713.
125. Kuhn P.S., Barbosa M.C., Levin Y.: Complexation of DNA with cationic surfactant. „Physica A" 1999, 269, p.278-284.
126. Kühn R., Pattard M.: Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (Scenedesmus subspicatus) in the cell multiplication inhibition test. „Water.Res." 1990, vol.24, (1), p.31-38.
127. Kümmurer K., Eitel A., Braun U., Hubner P., Daschner F.: Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid–phase extraction and HPLC with post-column ion-pairing and fluorescence detection. „J.Chromatogr. A" 1997, vol.774, p.281-286.
128. Lagerman R. i in.: Synthesis and Performance of ester quaternary biodegradable. „ JAOCS" 1994, vol.71, (1), p.97-100.
129. Larson R.J., Vashon R.D.: Adsorption and biodegradation of cationic surfactants in laboratory and environmental systems. „Dev. Ind. Microbiol." 1983, vol.24, p.425-434.
130. Ledent P., Michels H., Blackman G., Naveau H.: Reversal of the inhibitory effect of surfactants upon germination and growth of a consortium of two strains of Bacillus. „Asl. Microbiol Biotechnol." 1999, t.51, s.370-374.
131. Lewis M.A.: Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals; a review and risk assessment. „Wat. Res." 1991, vol.25, (1), p.101-113.
132. Li H.Q., Schröder H.F.: Surfactants – standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by Dapnia magna and Vibrio fischeri. „Water Science and Technology" 2000, vol.42, (7-8), p.391-398.
133. Loubinoux B., Malek H.: Interactions of quaternary ammonium salts with wood. „Holzforschung" 1992, vol.46, (6), p.537-539.
134. Lutnicka H., Bogacka T., Wolska L.: Degradation of pyrethroids in an aquatic ecosystem model. „Wat.Res." 1999, vol.3, (16), p.3441-3446.

135. Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H.: Handbook of Chemical Property Estimation Methods – Environmental Behaviour of Organic Compounds. McGraw-Hill, New York 1982.
136. Łebkowska M.: Stan i perspektywy rozwoju metod badań toksyczności i biodegradacji. „Biotechnologia" 1992, t.16, nr 1, s.39-46.
137. Łebkowska M.: Badania toksykologiczne w ochronie wód. Materiały XV Sympozjum „ Badania toksykologiczne w ochronie wód", Warszawa 1995.
138. Łebkowska M., Załęska–Radziwiłł M., Słomczyńska B.: Toksykologia środowiska, Wydawnictwo Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999.
139. Łebkowska M., Załęska–Radziwiłł M.: Toxicity Assessment of wood preservatives. In Proceedings of World Congress „Secotox", Kraków 2001, p.173-175.
140. Malanowska M., Piekacz H., Kiss E.: Wykrywanie pozostałości związków powierzchniowo czynnych na powierzchni naczyń stykających się z żywnością. „Roczniki PZH" 1987, t.38, nr 6, s.539- 543.
141. Marcinkiewicz–Salmonowiczowa J.: Zarys chemii i technologii kosmetyków. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 1995.
142. Markiewicz Z.: Struktura i funkcje osłon bakteryjnych. PWN, Warszawa 1993.
143. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. „Mutat.Res." 1983, vol.113, p.173-215.
144. Mark U., Solbé L.: Analysis of the ECOTOX aquatic toxicity (EAT) database V-the relevance of Daphnia magna as a representative test species. „Chemosphere" 1998, vol.36, (1), p.155-166.
145. Masuda F., Machida S., Kanno M.: Studies on the biodegradability of some cationic surfactants. In Proceedings of VII International Congress on Surface-Active Substances, Moscow 1978, vol.4, p.129-138.
146. May A., Neufahrt A.: Zum okologischen Verhalten von Kationtensiden, 3 Mitt.: Uber das Vehalten von Distearyldimethylammoniumchloride in Belebtschlamm-anlagen. „Tenside Detergents'' 1976, vol.13, p.65-69.
147. Mazayeni F.: Molecular spectroscopy of cationic surfactants.[in]: Cross J.Singer E.: „Cationic Surfactants. Analytical and Biological Evaluation", t.53, ed.M. Dekker, New York-Basel 1994.
148. Michael A.L., Hamm B.G.: Environmental modification of the photosynthetic response of lake plankton to surfactants and significance to a laboratory – field comparison. „Water. Res." 1986, vol.20, (12), p.1575-1582.

149. Michael A.L.: Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. „Wat. Res." 1991, vol.25, (1), p.101-113.
150. Microtox Manual: Microbics Corporation, carlsbad, CA 1992, p.201-232.
151. Młynarczyk W., Ewertowska M., Włosian D., Zabielska–Matejuk J.: Badania toksykometryczne wybranych czwartorzędowych soli imidazoliowych. „Bromat. Chem. Toksykol." 2000, t.33, nr 2, s.143-150.
152. Młynarczyk W., Adamska T., Branicka M.: Toksyczność ostra chlorków pirydyniowych z podstawnikiem alkoksymetylowym, [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce" Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.323-336.
153. Młynarczyk W., Ewertowska M., Zabielska–Matejuk J.: Ocena toksykometryczna wybranych soli imidazoliowych. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce". Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.327-339.
154. Mrozowska J., Galimska-Stypa R., Małachowska-Juszt A., Zabłocka-Godlewska E.: Laboratorium z mikrobiologii ogólnej i środowiskowej. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Skrypty Uczelniane nr 2144, Gliwice 1999.
155. Müller E., Loeffler W.: Zarys mykologii. Wyd. II, PWRiL, Warszawa 1987.
156. Nałęcz-Jawecki G., Grabińska-Sota E., Narkiewicz P.: The toxicity cationic surfactants in four bioassays. „Ecotoxicology and Environmental Safety" 2003, vol.54, p.87-91.
157. Naraniecki B., Marciński M.: Środki wspomagające dzialanie pestycydów - światowe kierunki rozwoju a sytuacja w kraju. „Przemysł Chemiczny"1995, t.74, nr 7, s.247-249.
158. Nielsen A.M., Meyera J.D., Blechmann C.A.: LAS biodegradation: ultimative fate of alkyl and ring carbon. Soap. „Cosmet. Chem. Spec." 1980, vol.56, (3), p.48-58.
159. Nishiyama N., Toshima Y., Ikeda Y.: Biodegradation of alkyltrimethylammonium salts in activated sludge. „Chemosphere" 1995, vol.30, (3), p.593-603.
160. Nishiyama N., Toshima Y., Ikeda Y.: Microbial degradation of alkyltrimethylammonium salts by activated sludge and isolated microorganisms. Proc.4 th World Surfactants Congress, Barcelona 1996, vol.3, p.143-154.

161. Noll L.: Verbrauch von tensiden in wasch-und reinnigungsmitteln. „Tenside Detergents" 1991,vol. 28, (2), p. 90-92.
162. Nyberg H.: Growth of Selenastrum capricornutum in the presence of synthetic surfactants. „Wat. Res." 1988,vol.22, (2), p.217-223.
163. Oda Y.: Evaluation of the New system (umu test) for the detection of environmental mutagens and cancirogens. „Mutat.Res." 1985, vol.147, p. 219-250.
164. Ogonowski J., Tomaszkiewicz-Potępa A.: Związki powierzchniowo czynne. Wyd. Politechniki Krakowskiej, Kraków 1999.
165. OECD (1992): Report of the OECD workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment, OECD Monograph No.59. ref.: Plassche E.V, Feijtel, *Risk characterization of 4 major surfactants used in the Netherlands*. Proc. 4 th World Surfactants Congress, Barcelona, 3-7.06.1996, vol. 3, p.246-260.
166. OECD: Wytyczne OECD do badań toksyczności substancji chemicznych. Przekład oficjalnej wersji wydania w jęz. ang. Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec 1997.
167. Opracowanie sporządzone przez Izbę Gospodarczą „Wodociągi Polskie": „Wybrane informacje techniczo-ekonomiczne o firmach wodociągowo-kanalizacyjnych". Bydgoszcz 2002.
168. Opracowanie sporządzone przez IMiGW dla UW w Katowicach: Charakterystyka hydrologiczna województwa katowickiego. Katowice 1992.
169. Opracowanie sporządzone przez IMiGW dla UW w Katowicach: Charakterystyka hydrologiczna województwa ślaskiego. Katowice 2002.
170. Osburn Q.W.: Analitycal method for cationic fabric softener in waters and wastes. „JAOCS" 1982, vol.59, (10), p.453-457.
171. Ostasiewicz S., Rusnak Z., Siedlecka U.: Statystyka, elementy teorii i zadania. Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej, Wrocław 2001.
172. Pacha J., Galimska-Stypa R.: Właściwości mutagenne wybranych związków trój- i sześciowartościowego chromu. „Acta Biologica Silesiana" 1986, t.3, s.20-26.
173. Pantani C., Spreti N., Maggitti M.C., Germani R.: Acute toxicity of some synthetic cationic and zwitterionic surfactants to freshwater amphipod Echinogammarus tibaldii. „Bull. Environ. Contam.Toxicol." 1995, vol.55, p.179-186.

174. Pasanen P., Kalliokoski P., Pasanen A.L.: The effectiveness of some disinfectants and detergents against microbial. „Building and Environment" 1997, vol.32, (3), p.281-287.
175. Pernak J., Szymanowski J., Pujanek S., Kucharski S.: Synthesis and Bactericidal of Some Pyridinium Chlorides with Alkylthiomethyl Hydrophobic Groups. „J. Am. Oil. Chem. Soc." 1979, vol.56, p.830-833.
176. Pernak J., Grabińska E., Zdybiewska M.: Zdolność do biodegradacji chlorków alkilotiometyloamoniowych. „Przemysł Chemiczny" 1982, t.61, nr 1-4, s.30-34.
177. Pernak J.: Chlorki alkilotiometyloamoniowe ich otrzymywanie i właściwości. Rozprawy nr 134. Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań 1982.
178. Pernak J.: Anticorrosion properties of quaternary ammonium chlorides with alkylthiomethyl radical. „Werkstoffe und Korrosion" 1984, vol.35, p.156-159.
179. Pernak J., Krysiński J., Kuncewicz Z.: Wirkung neuer quartärer pyridiniumverbindungen gegen ausgewählte Bakterien-und Plzstämme. „Pharmazie" 1984, vol.39, (11), p.782-783.
180. Pernak J., Jędraszczyk J., Krysiński J.: Wirkung neuer quartärer Iminiumverbindungen gegen ausgewählte Bakterien – und Plzstämme. „Pharmazie" 1987,vol.42, (6), p.422.
181. Pernak J., Krysiński J., Skrzypczak A., Michalak L.: Badania nad skutecznością nowych czwartorzędowych chlorków amoniowych wobec wybranych szczepów bakterii i grzybów. „Acta Polon. Pharm." 1989, t.16, nr 2, s.119-126.
182. Pernak J., Poźniak R.: Badania antyelektrostatycznych właściwości wybranych chlorków pirydyniowych. „Polimery – Tworzywa Wielkocząstkowe" 1990, nr 9, s.320-323.
183. Pernak J., Skrzypczak A.: 3-Alkylthiomethyl-1-ethylimidazolium chlorides. Correlation between critical micelle concentrations and minimum inhibitory concentrations. „Eur.J.Med.Chem." 1996, vol.31, p.901-903.
184. Pernak J.: Chlorki alkoksymetyloamoniowe i alkilotiometyloamoniowe. Mat. III Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1997, s.45-56.
185. Pernak J.: Otrzymywanie i właściwości czwartorzędowych soli amoniowych. Mat.IV Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1998, s.41-50.

186. Pernak J., Zabielska-Matejuk J., Urbanik E.: New quaternary ammonium chlorides - wood preservatives. „Holzfforschung" 1998, vol.52, (3), p. 249-254.
187. Pernak J., Mirska I., Kmiecik R.: Antimicrobial activities of new analogues of benzalkonium chloride. „Eur. J. med. Chem." 1999, vol.33, p.765-771.
188. Pernak J., Rogoża J., Mirska I.: Syntesis and antimicrobial activites of new pyridinium and benzimidazolium chlorides. „Eur. J. Med. Chem." 2001, vol.36, p.313-320.
189. Piątkowski J.: Auksotrofia a wrażliwość drobnoustrojów na czwartorzędowe sole amoniowe. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław 1993.
190. Pitter P.: Biodegradation of cationic agent in laboratoy models of activated sludge tanks. Wydawnictwo SB VSChT, Praha 1961, vol.52, p.25-42.
191. Pinazo A., Diz M., Solans C., Pes M.A., Erra P., Infante M.R.: Synthesis and properties of containing a disulfide bond. „Journal of Am. Oil Chem.Soc." 1993, vol.70, (1), p.37-42.
192. Plassche E., Bruijn J., Stephenson R., Marshall S., Feijtel T., Belanger S.: Predicted no-effect concentrations and risk characterization of four surfactants: linear alkyl benzene sulfonate, alkohol ethoxylates, alcohol ethoxylated sulfates, and soap. „Environmental Toxicology and Chemistry" 1999, vol.18, (11), p. 2653-2663.
193. PN-74/C–04578/03 - Woda i ścieki. Oznaczanie ChZT metodą dwuchromianową.
194. PN-ISO 11269-1 - Jakość gleby. Oznaczenie wpływu zanieczyszczeń na florę glebową. Metoda pomiaru hamowania wzrostu korzeni.
195. Podbielski Z., Rejment-Grochowska I., Skirgiełło A.: Rośliny zarodnikowe. PWN, Warszawa 1982.
196. Posłuszny S., Leczykiewicz T., Skrzypczak A.: Elektrolityczne wydzielanie niklu w obecności czwartorzędowych soli amoniowych. [w:] Materiały IV Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1998, s.120.
197. Posłuszny S., Leczykiewicz T., Skrzypczak A.: Właściwości powłok niklowych otrzymanych z kąpieli modyfikowanych czwartorzędowymi solami amoniowymi. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce''. Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.366-369.

198. Poźniak R.: Czwartorzędowe sole amoniowe jako środki antystatyczne. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce". Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001.
199. Puchta P., Krings P., Sandkühler P.: A new generation of softeners. „Tenside Detergents" 1993, vol.30, (3), p. 186-192.
200. Quillardet P., Hofnung M.: The SOS Chromotest a review. „Mutat. Res." 1993, vol. 297, (3), p.235.
201. Reng A.K.: Herstellung kationischer tenside und ihre kosmetischen anwendungsmo – glichkeiten. „SOFW" 1984; (4), p. 90-94.
202. Reuter G.: Skuteczność mycia i dezynfekcji w przemyśle mięsnym. „Medycyna Wet." 1995, t.51, nr 3, s.128-133.
203. Rocznik Statystyczny – Ochrona Środowiska. Główny Urząd Statystyczny. Warszawa 2001.
204. Rosenkranz H.S.: Determining the DNA-modifying activity of chemicals using DNA polymerase-deficient Escherichia coli. [w:] Chemical Mutagens.Vol.6. Eds F.J. de Serres, A.Hollaender, Plenum Publishing Company, New York 1980.
205. Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 9 września 1998 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wyroby ze względu na potrzebę ochrony zdrowia i środowiska.
206. Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 18 lutego 1999 r. w sprawie substancji chemicznych stwarzających zagrożenie dla zdrowia lub życia.
207. Rucka M.: Zwalczanie bakterii i glonów występujących w urządzeniach chłodniczych przy użyciu czwartorzędowych soli amoniowych. Rozprawa doktorska, Politechnika Wrocławska 1976.
208. Rybak J.: Bezkręgowe zwierzęta słodkowodne – Przewodnik do rozpoznawania. PWN, Warszawa 2000.
209. Sánchez J., González K., Kaiser K.L.E., Palabrica V.S., Comelles F., Garcia M.T.: On toxicity and biodegradation of cationic surfactants. „Acta hydrochim.hydrobiol." 1994,vol.22, (1), p.13-18.
210. Scott M.J., Malcolm N.J.: The biodegradation of sufractants in the environment. „Biochimica et Biophysica Acta" 2000, vol.1508, p.235-251.
211. Schöberl P.: Ökologische Bewertung von Tensiden. „Tenside Detergents" 1997, vol.34, (1), p.28-36.

212. Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Mboden D.: Environmental Organic Chemistry.John Wiley & Sons, Inc. New York 1993.
213. Shirley D.A.: Chemia organiczna. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1964.
214. Skrzypczak A., Brycki B., Mirska I., Pernak J.: Synthesis and antimicrobial activities of new quats. „Eur.J.Med.Chem." 1997, vol.32, p.661-668.
215. Soszka G., Teisseyre K.: Moje hobby akwarium. Wydawnictwo Kultura Życia Codziennego, Warszawa 1990.
216. Stańczykowska A.: Zwierzęta bezkręgowe naszych wód. Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa 1986.
217. Stawskaja S.S., Udod W.M, Tarnawa Ł.A., Kriwiec I.A.: Mikrobiołogiczeskaja oczistka wody od powierchnostno aktiwnych wieszczestw. Naukowa Dumka, Kijew 1988.
218. Suder P., Międzybrodzki J.: Ocena aktywności mutagennej ścieków przemysłowych z Krakowskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa'' z zastosowaniem mutantów auksotroficznych bakterii Escherichia Coli. „Archiwum Ochrony Środowiska'' 1999, t.25, nr 2, s.99-112.
219. Sullivan D.E.: Biodegradation of cationic surfactant in activated sludge. „Water Res." 1983, vol.17, (9), p.1145-1151.
220. Swisher R.D.: Surfactant Biodegradation. 2 nd Ed.Marcel Dekker, Inc., New York 1987.
221. Szczawiński J.: Problemy dezynfekcji w polskim przemyśle spożywczym. „Medycyna Wet." 1995, t.51, nr 3, s.133-136.
222. Szuliński S., Chyba A., Madziarka S.: Przewlekłe toksyczne działanie substancji powierzchniowo czynnych o różnej budowie chemicznej. „Roczn. PZH" 1996, t. 47, nr 2, s.159-165.
223. Śliwa W.: N-podstawione sole pirydyny i związków pokrewnych; synteza, właściwości, zastosowanie.Wydawnictwo WSP, Częstochowa 1996.
224. Świderska–Bróż M.: Mikrozanieczyszczenia w środowisku wodnym. Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1993.
225. Tadeusiewicz R., Izworski A., Majewski J.: Biometria. Wydawnictwo AGH, Kraków 1993.
226. Tamamushi T.,Watanabe N.: β-Hydroxydodecyldimethylbenzyl ammonium chloride as a new cationic surfactant. „Tenside Detergents" 1980, vol.17, p.193-195.

227. Täuberg G., May A.: Chemismus, eigenschaften und anwendung der kationischen tenside. „Tenside Detergents" 1982, vol.19, (3), p. 151-154.
228. Tuchołka D.: Metody spektroskopii absorpcyjnej i odbiciowej w analizie chemicznej. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Poznań 1996.
229. Tsunoda K.T.: Effect of alkyl chain length on the fungicidal efficacy of benzalkonium chloride. „Bokin Bobai'' 1990, vol.18, p.185-189.
230. Ullman's: Encyclopedia of industrial chemistry. Ed.Wiley, 6 th Edition, Weinheim 2002.
231. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J., Fojutowski A.: Aktywność biologiczna czwartorzędowych związków amoniowych w stosunku do grzybów rozkładających i przebarwiających drewno. Prace Instytutu Technologii Drewna, Poznań 1994, z.3/4, s.33-55.
232. Urbanik E., Fojutowski A.: Proekologiczne aspekty zabezpieczenia drewna środkami przeciwgrzybicznymi. Mat. II Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce". Poznań 1996, s.5-23.
233. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J.: Czwartorzędowe sole amoniowe z podstawnikiem alkoksymetylowym w ochronie drewna. Mat. II Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce". Poznań 1996, s.69-82.
234. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J.: Wpływ struktury czwartorzędowych soli imidazoliowych na skuteczność zabezpieczenia drewna gatunków iglastych i liściastych. Mat. III Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce". Poznań 1997, s.9-19.
235. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J., Skrzypczak A., Pernak J.: Antifungal properties of new imidazolium chlorides against Coniophora puteana, Trametes versicolor, Chaetomium globosum. „Material und Organismen" 1997, Bd. 31, H.3, s.247-264.
236. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J., Pernak J.: Czwartorzędowe sole amoniowe w ochronie drewna. Mat. IV Międzynarodowego Symp. „Forum Chemiczne", Warszawa 1998, s.111.
237. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J.: Przydatność soli imidazoliowych do zabezpieczenia drewna przed grzybami wywołującymi rozkład szary. [w:] Materiały IV Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1998, s.51-64.

238. Urbanik E., Zabielska–Matejuk J., Skrzypczak A.: Quantitative relation between surface active properties and antifungal activity of quaternary imidazolium chlorides (new wood preservatives). „Forest Products Journal" 1999, vol. 49, (10), p.53-58.
239. Urbanik E., Zabielska–Matejuk J.: The resistance of the wood destroying fungi against diammonium copunds. Prace Instytutu Technologii Drewna, Poznań 2000, z. 1/2, p.3-10.
240. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J.: Podwójne sole amoniowe jako nowe biocydy w ochronie drewna. [w:] Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania. Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.67-78.
241. Urbanik E., Zabielska-Matejuk J., Skrzypczak A.: Wpływ wielkości pierścienia cykloalkilowego w czwartorzędowych solach amoniowych na rozwój grzybów niszczących drewno. [w:] Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania. Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.435-439.
242. Ustawa z dnia 3 kwietnia 1993 r. O badaniach i certyfikacji. Dz.U. Nr 55, poz.250.
243. Ute M., Solbe J.: Analysis of the Ecetoc Aquatic toxicity (EAT) database V-the relevace of *Daphnia magna* as a representative test species. „Chemosphere" 1998, vol.36, (1), p.155-166.
244. Utsunomiya A., Watanuki T., Matsuhita K., Tomita I.: Toxic effects of linear alkylbenzenesulfonate and quaternary alkylammonium chloride on Dunaliella sp. As measured by ^{1}H NMR analysis of glycerol. „Chemosphere" 1997, vol.35,(6), p.1215-1226.
245. Utsunomiya A., Watanuki T., Matsuhita K., Tomita I.: Assessment of the toxicity of linear alkybenzene sulfonate and quaternary alkylammonium chloride by measuring C – glycerol in Dunaliella sp. „Chemosphere" 1997, vol.35, (11), p.2479-2490.
246. Utsunomiya A., Watanuki T., Matsuhita K., Tomita I.: Toxic effects of linear alkylbenzenesulfonate, quaternary alkylammonium chloride and their complexes on Dunaliella sp.and Chlorella Pyrenoidosa. „Environmental Toxicology and Chemistry" 1997, vol.16, (6) , p.1247-1254.
247. Van Ginkel C.G., Kolvenbach M.: Relations between structure of quaternary alkyl ammonium salts and their biodegrability. „Chemosphere" 1991, vol.28, p.281-289.

248. Van Ginkel C.G.: Biodegradability of cationic surfatants [w]: Biodegradability of surfactants, ed.Karsa D.R. & Porter M.R., Blackie Academic & Professional, Glasgow 1995.
249. Versteeg D.J., Stanton D.T., Pence A., Cowan C.: Effects of surfactants on the rotifer, Brachionus Calyciflorus, in a chronic toxicity and in the development of QSAR. „Environmental Toxicology and Chemistry" 1997, vol.16, (5), p.1051-1058.
250. Vievsky A.: Cationic surfactants: new perspectives in medicine and biology. „Tenside Detergents" 1997, vol.34, (1), p.18-20.
251. Vismara C., Garavaglia A.: 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid Containing Compounds. Genotoxicity Evaluation by Mutatox Assay and Comparision with Acute (Microtox) and Embryo (Fetax) Toxicitie. „Bull. Environ. Contam. Toxicol." 1997, vol. 58, p.582-588.
252. Vives-Rego J., Vaque M.D., Sanchez L.J., Parra J.: Surfactants biodegradation in sea water. „Tenside Detergents" 1987, vol.24 , p.20-22.
253. Walker L.E., Lichtenberg F.: Dialkyl Quants as wood preservatives. Mat. III Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1997, s.57-71.
254. Waters J.: A new rinse conditioner active with improved environmental properties. „Tenside Detergents" 1991, vol.28, p.460-469.
255. Waters J.: Analysis of low conentrations of cationic surfactants in laboratory test liquars and environmental sample [in]: Cross J., Singer E.: *Cationic Surfactants. Analytical and Biological Evaluation*, vol.53, ed. M. Dekker, New York-Basel 1994.
256. Ważny J., Rudniewski P., Krajewski K.J., Ważny T.: The reflectance method for testing the fungicides effectiveness against surface-mould of materials. Part 1. „Wood Science and Technology" 1989, vol.23, (2), p.179-189.
257. Ważny J.: Zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych w produkcji środków ochrony drewna przed degradacją biologiczną. Mat.II Symp. „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1996, s.37-46.
258. Węglewski J., Pernak J., Krajewski J.: Synthesis and Bactericidal Properties of Pyridinium Chlorides with Alkylthiomethyl and Alkoxymethyl Hydrophobic Groups. „Journal of Pharmaceutical Sciences" 1991, vol.80, (1), p.91-95.

259. White G.F., Russel N.J.: What is biodegradation? [in]: „Biodegradability of surfactants", ed. Karsa D.R. & Porter M.R., Blackie Academic & Professional, Glasgow 1995 .
260. Wiktorowicz W., Krysiński J., Skrzypczak A., Kalisza R.: Ilościowe zależności między strukturą a właściwościami antyelektrostatycznymi w grupie czwartorzędowych soli amoniowych. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania". Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.454-458.
261. Witek S.: Biologiczna aktywność czwartorzędowych soli amoniowych i izosomotropowych amin. Materiały IV Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1998, s.7-20.
262. Woltering D.M., Larson R.J., Hosing W.D., Jamieson R.A.: The environmental fate and effects of detergent. „Tenside Detergents" 1987, vol.24, p.286-295.
263. Wong Y.L., Curfaman C.L., Doncel G.F.: Spermicidal, anti-HIV, and micellar properties of diand trihydroxylated cationic surfactants. „Tetrahedron" 2002, vol.58, p.45-54.
264. Wyrzykowska U., Kaczorowski K., Kwiatkowski M.: Synteza i formulacja preparatów chwastobójczych opartych na N-fosfonometylo-glicynie. „Przemysł Chemiczny" 1994, nr 7, s.273-276.
265. Yoshimura K., Machida S., Masuda F.: Biodegradation of long chain alkylamines. „J.Am.Oil Chem.Soc." 1980, vol.57, p.238-241.
266. Zabielska-Matejuk J., Fojutowski A.: Działanie przeciwsiniznowe czwartorzędowych pochodnych amin tłuszczowych. „Przemysł Drzewny" 1995, t.46, nr 10, s.9-11.
267. Zabielska-Matejuk J., Makoś W., Fojutowski A.: Środek grzybobójczy. Patent RP nr 166934, 1995.
268. Zabielska-Matejuk J., Fojutowski A., Jerzykiewicz W.: Czwartorzędowe sole amoniowe w ochronie tarcicy przed sinizną. Materiały IV Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania w gospodarce", Poznań 1998, s.139.
269. Zabielska-Matejuk J.: Synteza i właściwości grzybobójcze czwartorzędowych soli imidazoliowych z podstawnikiem alkoksymetylowym. Wydawnictwo Instytutu Technologii Drewna, Poznań 1999, z.3/4, s.3-72.

270. Zabielska-Matejuk J.: Przydatność kationowych surfaktantów do zabezpieczenia drewna brzozy przed grzybami rozkładu brunatnego i białego. [w:] „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania". Wyd. Instytut Technologii Drewna, Poznań 2001, s.469-474.
271. Zajusz K., Żyłka M.: Wpływ niektórych detergentów na przebieg narkozy barbituranowej. „Bromat. Chem. Toksykol." 1976, nr 3, s.295-299.
272. Załęska-Radziwiłł M.: Zastosowanie empirycznych modeli statystycznych do obliczania stężeń bezpiecznych związków chemicznych dla biocenoz wodnych. Materiały na XVII Sympozjum „Badania toksykologiczne w ochronie wód", Warszawa 1997, s.55-68.
273. Załęska-Radziwiłł M.: Wyznaczanie bezpiecznych stężeń zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych na podstawie testów toksykologicznych. „Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych" 1999, t.18, s.491-501.
274. Zarządzenie Dyrektora Centrum Badań i Certyfikacji z dnia 20 maja 1994 r. w sprawie ustalenia wykazu wyrobów podlegających obowiązkowi zgłaszania do certyfikacji na znak bezpieczeństwa i oznaczania tym znakiem. Monitor P. Nr 39, poz. 335
275. Zdybiewska M., Grabińska E.: Badania nad biodegradacją i toksycznością wybranych związków powierzchniowo czynnych. Materiały Sympozjum „Biodegradacja i toksyczność substancji zanieczyszczających wody powierzchniowe", Radziejowice 1981.
276. Zieliński R.: Surfaktanty towaroznawcze i ekologiczne ich stosowanie. Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej, Poznań 2000.
277. Zieliński W., Rajca A.: Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
278. Żurawska M.: Wpływ różnych dawek 2,4-D na siewki pomidorów i mikroflorę glebową w doświadczeniach testowych, Materiały pokonferencyjne „Bioindykacja skażeń przemysłowych i rolniczych", PAN, Wrocław 1983.

OCENA ODDZIAŁYWANIA CZWARTORZĘDOWYCH SOLI AMONIOWYCH NA ŚRODOWISKO WODNE

Streszczenie

Zgodnie z wprowadzanymi w ciągu ostatnich pięciu lat rozporządzeniami, służącymi ochronie środowiska naturalnego, zaleca się, aby każdy związek chemiczny przed dopuszczeniem do obrotu handlowego był poddany ocenie różnorodnych oddziaływań na środowisko. Rezultaty tej oceny są podstawą podejmowania decyzji o dopuszczeniu nowych chemikaliów do stosowania lub wycofywania już stosowanych. Dają także impuls do poszukiwania nowych związków chemicznych o mniejszym stopniu ryzyka dla środowiska. Poważną pozycję wśród substancji chemicznych niewątpliwie potrzebnych, a jednocześnie negatywnie oddziałujących na środowisko, zajmują czwartorzędowe sole amoniowe (CSA). Biorąc pod uwagę powszechność ich stosowania, należy przypuszczać, że migrują one do wód powierzchniowych. Ze względu na brak jednoznacznych danych w literaturze o mechanizmie ich biologicznego rozkładu w ekosystemie wodnym i oddziaływaniu metabolitów tych przemian na organizmy żywe, podjęto próbę oceny wpływu nowej generacji CSA na to środowisko.

W pracy wykazano, że zarówno o szybkości rozkładu biologicznego, jak również o odmienności oddziaływania na biocenozę wodną decydowała struktura związku, a szczególnie takie elementy, jak: długość łańcuchów węglowodorowych, obecność pierścieni aromatycznych lub cyklicznych oraz atomów siarki bądź tlenu w podstawniku alkilowym. Badane struktury z układem alifatycznym i heterocyklicznym wykazały odmienne działanie na przedstawicieli łańcucha pokarmowego ekosystemu wodnego. Najmniej toksycznie działały na ryby, natomiast najbardziej wrażliwe ogniwo w łańcuchu troficznym stanowili producenci (glony). Przeprowadzone testy toksyczności nie wykazały działania genotoksycznego w stężeniach, w których związki występują w wodach naturalnych, ani też ich produktów biologicznego rozkładu.

Rezultaty badań podatności na biodegradację udowodniły, że wszystkie preparaty są biologicznie rozkładalne w środowisku wodnym, a czas połowicznego rozkładu wahał się od 0,5 do 1,6 doby w zależności od testowanego związku. Niezależnie jednak od szybkości, mechanizm biologicznego rozkładu wszystkich badanych grup substancji, śledzony dzięki spektroskopii NMR, był podobny.

Wykorzystując rezultaty badań testów toksyczności oraz biodegradacji oceniono ryzyko zagrożenia wód czwartorzędowymi chlorkami amoniowymi z podstawnikiem alkoksymetyloamoniowym i alkilotiometylowym. Wykazano, że związki te stanowią zagrożenie dla wód. W końcowym etapie badań, wykorzystując empiryczny model statystyczny, wyznaczono stężenie bezpieczne czwartorzędowych soli amoniowych, przy którym 95% gatunków jest chronione.

EVALUATION OF IMPACT OF QUATERNARY AMMONIUM CHLORIDES ON WATER ENVIRONMENT

Abstract

During last five years many decrees and instructions considering protection of natural environment have been introduced. It is recommended to evaluate environmental impact of each newly introduced in trade turnover organic. Results of this evaluation should be the base of information during decision making process while new chemicals are entrancing and outworn ones are withdrawing. Results of environmental studies often stimulate development of new compounds with significantly lower level of environmental risk. Very important group of chemicals are quaternary ammonium chlorides. They are useful, have many applications, but they also could heavily contaminate natural environment. It should be supposed that those compounds can get into surface waters. There is no reliable data in literature about the mechanism of their biological decomposition in aquatic ecosystems and impact of metabolites living organisms. Therefore following studies considering evaluation of environmental impact of new generation of QAS were undertaken.

During the research it was shown that speed of biological decomposition and differences in the effect on aquatic biocenose was dependent on the structure of compound. The most important was: length of hydrocarbon chains, their correlation, presence of aromatic or cyclic rings and presence of sulphur or oxygen atoms in alkyl substitute. Structures with aliphatic and heterocyclic systems showed different effects on representatives of food chain in water ecosystems. The less sensitive were fish and the most sensitive were producers (algae).

Genotoxic properties of biological decomposition products in concentration they are present in natural environment were not confirmed. It was proved that all preparations were biological degradable in water environment with half life between 0.5 to 1.6 day. Despite of the speed of the process, mechanism of biological decay of all investigated groups was similar.

At the base of obtained results risk of QAS with alkoxymethyl and alkyltiomethyl substitutes was calculated. It was shown that those compounds constitute great risk to natural waters. Therefore at the last stage of research no-effect concentration (when 95% of species are protected) was calculated with the usage of static empirical calculation model.

Wydano za zgodą
Rektora Politechniki Śląskiej

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ
ul. Akademicka 5, 44-100 Gliwice
http://loki.polsl.pl/wydawnictwo

Sprzedaż i Marketing
Tel. (0-32) 237-18-48
Wydawnictwo_mark@polsl.pl

Nakład 150+50 egz. Ark. wyd. 10 Ark. druk. 9,125 Papier offset. Kl. III 70x100, 80 g

Oddano do druku 1. 03. 04. Podpisano do druku 1. 03. 04. Data ukończenia 18. 03. 04.

BIBLIOTEKA GŁÓWNA
Politechniki Śląskiej
P.3355/04/51

Druk: Drukarnia Gliwice, ul. Zwycięstwa 27, tel. 230 49 50

Wydawnictwo Politechniki Śląskiej
44-100 Gliwice, ul. Akademicka 5
tel./fax (0-prefiks-32) 237-13-81
http://loki.polsl.pl/wydawnictwo
Sprzedaż i Marketing:
tel. (0-prefiks-32) 237-18-48,
e-mail: wydawnictwo_mark@polsl.pl