

Alina Pruss

Przydatność metod turbidymetrycznej i respiracyjnej do oceny toksycznego wpływu wybranych fenoli na osad czynny

Określenie toksyczności chemikaliów w stosunku do mikroorganizmów osadu czynnego jest istotnym kryterium oceny ich dopuszczalnych stężeń w ściekach poddawanych biologicznemu oczyszczaniu. Stąd też niezmiernie istotne jest stosowanie szybkiej i efektywnej metody wymiernej oceny tego oddziaływania.

Powszechnie stosowaną metodą dającą odpowiedź wprost jest test respiracyjny [1], w którym toksyczność danego związku chemicznego szacowana jest na podstawie zmian stężenia tlenu. Ponieważ wzrost komórek mikroorganizmów osadu czynnego charakteryzowany jest zużyciem tlenu przez biomase, więc w przypadku toksycznego wpływu badanej substancji wzrost biomasy jest ograniczony, a zużycie tlenu ulega zmniejszeniu.

Można także korzystać z fluorescencyjnej metody oceny aktywności mikroorganizmów polegającej na pomiarze aktywności esteraz. W metodzie tej wykorzystywana jest reakcja hydrolizy nie wykazującej fluorescencji dwuoctanu fluoresceiny EDA, z którego przy udziale esterazy powstaje silnie fluoryzująca fluoresceina. Ilość powstałej fluoresceiny zależy od aktywności metabolicznej mikroorganizmów, a pomiar polega na rejestracji po określonym czasie intensywności fluorescencji badanej próbki [2].

Do metod prostych, ale nie stosowanych szerzej, można zaliczyć także metodę turbidymetryczną zaproponowaną przez Strotmanna [3]. Jej zasada oparta jest na założeniu, że gęstość optyczna zawiesiny mikroorganizmów osadu czynnego zależy od stężenia biomasy. Wprowadzenie toksyny powoduje zahamowanie wzrostu biomasy, czemu towarzyszy brak zmian gęstości optycznej próbki.

Biorąc pod uwagę możliwość praktycznego wykorzystania tej metody przeprowadzono badania porównawcze z metodą respiracyjną. Do badań użyto dwie substancje toksyczne: 4-nitrofenol i pentachlorofenol. Przy ich wyborze kierowano się praktycznymi trudnościami pracy komór osadu czynnego na oczyszczalni ścieków zakładów chemicznych BASF w Niemczech z dopływem ścieków przemysłowych zawierających te substancje.

Metodyka badań

Testy przeprowadzono wykorzystując w charakterze organizmów testowych (jako zaszczepek) osad czynny pobrany z tlenowej komory osadu czynnego znajdującej się na pilotowej

oczyszczalni ścieków w miejscowości Lundtofte w Danii (*Technical University of Denmark*).

Metoda turbidymetryczna

Metoda ta wymaga przygotowania odpowiedniej pożywki oraz zaszczepek organizmów testowych. Pożywkę przygotowano bazując na bulionie, który był mieszaniną ekstraktu wołowego, peptonu oraz soli mineralnych [3]. Jej odczyn do $\text{pH}=7,0 \pm 0,2$ regulowano przy użyciu 1-molowych roztworów HCl lub NaOH.

Zaszczepek przygotowano dodając 2 cm^3 osadu czynnego do 80 cm^3 pożywki. Tak przygotowaną mieszaninę poddano 20-godzinnej inkubacji na wytrząsarce w temperaturze 20-21 °C w kolbie stożkowej o pojemności 500 cm^3 .

Kulturę główną, używaną do testów toksyczności, przygotowano dodając do 200 cm^3 pożywki 6 cm^3 uprzednio przygotowanego zaszczepek i poddawano ją 1-godzinnej inkubacji w analogicznych warunkach jak poprzednio. Przyjęto, że po upływie 1 godziny inkubacji organizmy powinny znajdować się we wczesnej fazie wzrostu. Przygotowaną w ten sposób główną kulturę przelewano do kolb stożkowych zawierających różne ilości testowanych substancji toksycznych i po ich wymieszaniu poddawano je 6-godzinnej inkubacji.

Podczas prowadzenia testu próbki cały czas mieszano, co zapewniło jednolitą gęstość optyczną badanego materiału. Równocześnie z kulturami testowymi przygotowano próbkę kontrolną zawierającą organiczną pożywkę bez toksycznego materiału.

Próbki do analiz o objętości 3 cm^3 pobierano co godzinę do probówek zawierających 60 μl roztworu azydki sodu (100 g/dm^3), którego zadaniem było zahamowanie dalszego rozwoju mikroorganizmów. Następnie mierzono absorbancję przy użyciu spektrofotometru używając jako odniesienia próbkę kontrolną. W przypadku pentachlorofenolu zastosowano długość fali 400 nm, a dla 4-nitrofenolu – 600 nm. Wartości te odpowiadały maksymalnej absorbancji dla badanych substancji.

Efekt zahamowania wzrostu biomasy obliczono z zależności:

$$I = \frac{B_c - B_t}{B_c} 100 \quad (1)$$

gdzie:

I – inhibicja wzrostu, %

B_c – średnia wartość mierzzonej absorbancji po 6 h inkubacji w próbce kontrolnej,

B_t – średnia wartość mierzzonej absorbancji po 6 h inkubacji w testowanych próbkach.

Metoda respiracyjna

Badania przeprowadzono identycznie dla obu toksyn. Pożywka wg OECD 209 zawierała pepton, ekstrakt wołowy, mocznik, chlorek sodu, chlorek wapnia, siarczan manganu (II) oraz fosforan potasu [1]. Do kolb stożkowych o pojemności 500 cm³ nalewano po 16 cm³ pożywki, a następnie różne objętości badanej substancji toksycznej i uzupełniano wodą destylowaną do 300 cm³. Do każdej z kolb dodano 200 cm³ osadu czynnego o stężeniu biomasy 3,0 g/dm³. Całość napowietrzano przy pomocy perkolatora przez 3 godziny z wydajnością 0,5+1,0 dm³/min. Następnie po wyłączeniu napowietrzania przeprowadzono pomiary zużycia tlenu przez mikroorganizmy, mierząc zmiany jego stężenia w czasie 10 minut. Przygotowano dwie próbki kontrolne bez dodatku toksyny – pierwszą próbkę na początku eksperymentu (czas 0) i drugą na końcu eksperymentu. Procentową inhibicję wzrostu komórek bakteryjnych obliczono ze wzoru:

$$I = 1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}} \quad (2)$$

gdzie:

I – inhibicja wzrostu, %,

R_s – stopień zużycia tlenu w próbkach zawierających określone stężenia substancji toksycznej,

R_{c1} – stopień zużycia tlenu w pierwszej próbce kontrolnej,

R_{c2} – stopień zużycia tlenu w drugiej próbce kontrolnej.

Stopień zużycia tlenu obliczono z zależności:

$$R = \frac{C_0 - C_{10}}{C_0} \quad (3)$$

gdzie:

R – stopień zużycia tlenu,

C₀ – stężenie tlenu na początku eksperymentu (0 min),

C₁₀ – stężenie tlenu na końcu eksperymentu (10 min).

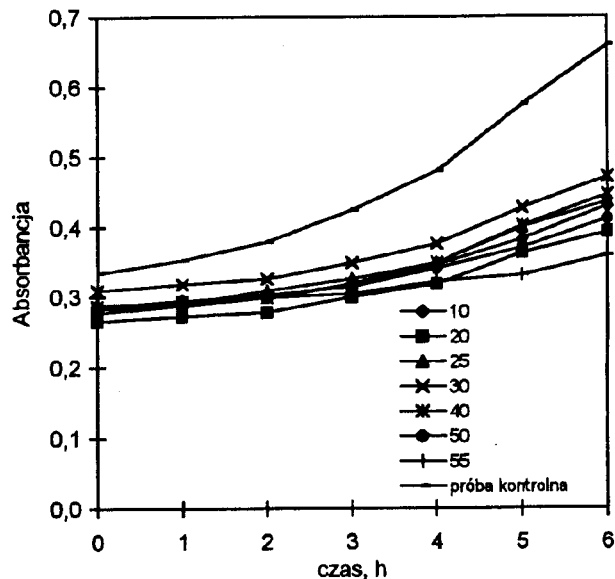
Ocena toksyczności badanych substancji

Za miarę stopnia toksyczności przyjęto stężenie badanej substancji powodujące inaktywację 50% mikroorganizmów, tzw. EC₅₀. W przypadku metody turbidymetrycznej odpowiadało to 50% obniżeniu mętności próbki, a dla testu respiracyjnego było to zmniejszenie o 50% zużycia tlenu przez mikroorganizmy. Wartość EC₅₀ obliczono korzystając z programu komputerowego IC_p wersja 2.0 (1993).

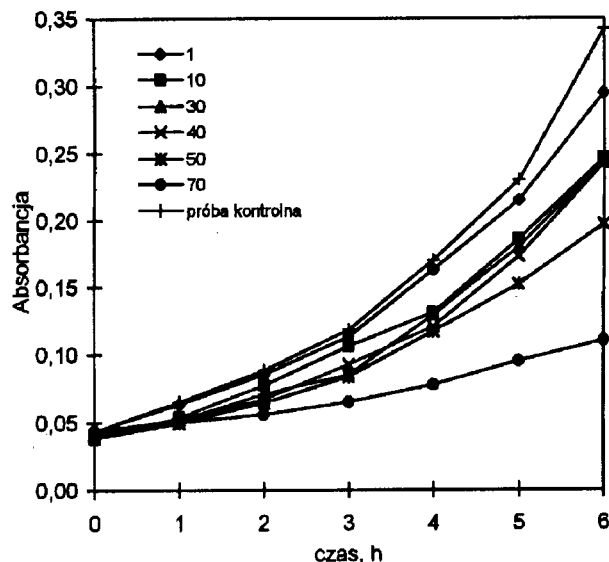
Wyniki badań

Toksyczność pentachlorofenolu badano w zakresie stężeń od 10 do 55 g/m³. Zmiany absorbancji w czasie, będące wynikiem zahamowania rozwoju mikroorganizmów, dla różnych stężeń pentachlorofenolu przedstawia rysunek 1. Jak z niego wynika, mikroorganizmy osadu czynnego zawarte w próbce kontrolnej cały czas wzrastały (wzrastała mętność próbki), jednak we wszystkich próbkach zawierających badaną substancję toksyczną widoczne było wyraźne zahamowanie wzrostu biomasy (mały wzrost mętności), zwiększające się wraz ze wzrostem stężenia.

Toksyczność 4-nitrofenolu badano w zakresie stężeń od 1 do 70 g/m³. Zmiany absorbancji będące wynikiem zahamowania rozwoju mikroorganizmów dla różnych stężeń 4-nitrofenolu przedstawia rysunek 2. W przypadku 4-nitrofenolu zahamowanie wzrostu biomasy następowało w miarę równomiernie do stężenia 50 g/m³. Wyraźny skok zaznaczył się w przypadku stężenia 70 g/m³. Nadal jednak absorbancja próbki rosła w czasie, co świadczyło, że część organizmów pozostała żywa.



Rys. 1. Zmiany absorbancji próbki w zależności od czasu i stężenia pentachlorofenolu (g/m³)



Rys. 2. Zmiany absorbancji próbki w zależności od czasu i stężenia 4-nitrofenolu (g/m³)

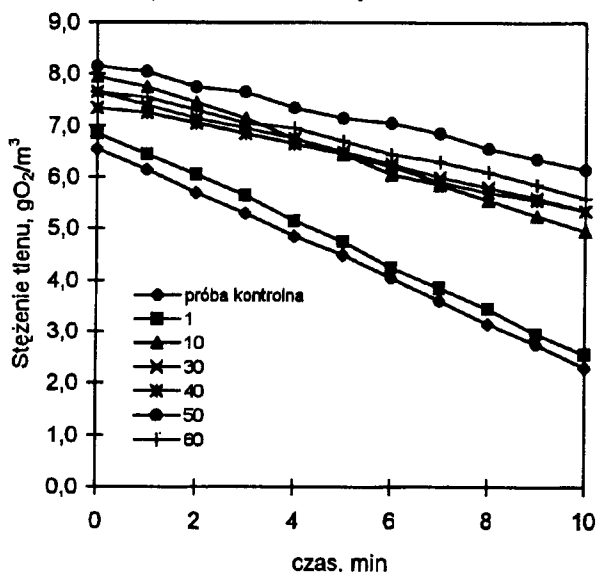
Korzystając z programu statystycznego określono stężenia badanych substancji toksycznych, wywołujących założone stopnie zahamowania rozwoju testowanych mikroorganizmów. Z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność pentachlorofenolu nie udało się oznaczyć stężenia odpowiadającego 50% inhibicji. W związku z tym w celu porównania działania obu badanych substancji zdecydowano się na oznaczenie dodatkowo stężeń wywołujących 10, 20, 30, 40% inhibicję. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Toksyczności badanych związków chemicznych oznaczone metodą turbidymetryczną

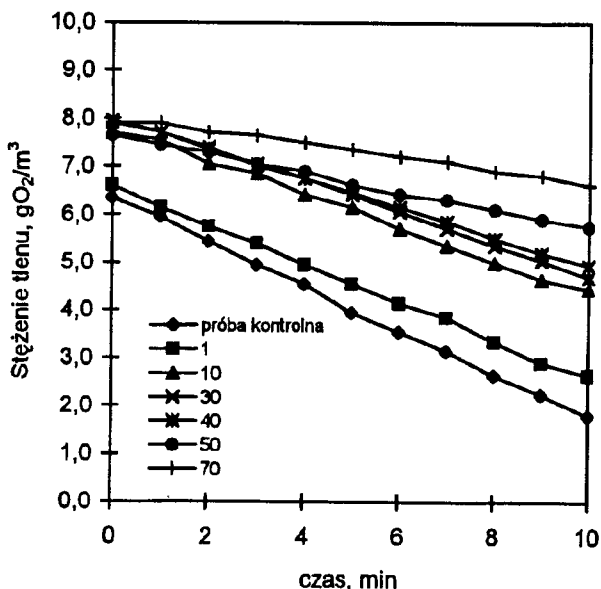
| Substancja | EC ₁₀ | EC ₂₀ | EC ₃₀ | EC ₄₀ | EC ₅₀ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | g/m ³ | g/m ³ | g/m ³ | g/m ³ | g/m ³ |
| Pentachlorofenol | 3 | 6 | 9 | 51 | – |
| 4-Nitrofenol | 1 | 5 | 41 | 48 | 56 |

W przypadkach obu badanych związków można wskazać dawkę, po dodaniu której widoczna była wyraźna inaktywacja mikroorganizmów osadu czynnego. Przy niskich stężeniach bardziej toksyczny był 4-nitrofenol. Później jednak, dopiero przeszło 8-krotne podwyższenie stężenia powodowało wzrost inhibicji z 20 do 30%. W przypadku pentachlorofenolu podobny skokowy wzrost stężenia wywoływał zmianę inhibicji z 30 do 40%. Porównując stężenia wywołujące 40% inhibicję można jednak stwierdzić, że toksyczności obu substancji oceniane metodą turbidymetryczną były podobne.

Wyniki uzyskane w przypadku stosowania metody respiracyjnej [1] przedstawiono na rysunkach 3 i 4. Ich analiza pozwala stwierdzić, że stężenia 1 g/m^3 obu substancji tylko w niewielkim stopniu wpływały hamująco na oddychanie mikroorganizmów osadu czynnego, jednak wzrost stężenia do 10 g/m^3 powodował już istotne zahamowanie respiracji. Jednakże nawet przy najwyższych stosowanych stężeniach badanych toksyn część mikroorganizmów nie uległa inaktywacji, o czym świadczyło stwierdzone zużycie tlenu.



Rys. 3. Zmiany stężenia tlenu w zależności od czasu i stężenia pentachlorofenolu (g/m^3)



Rys. 4. Zmiany stężenia tlenu w zależności od czasu i stężenia 4-nitrofenolu (g/m^3)

Tabela 2. Toksyczności badanych związków chemicznych oznaczone metodą respiracyjną

| Substancja | EC ₁₀ | EC ₂₀ | EC ₃₀ | EC ₄₀ | EC ₅₀ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | g/m^3 | g/m^3 | g/m^3 | g/m^3 | g/m^3 |
| Pentachlorofenol | 3 | 6 | 8 | 11 | 28 |
| 4-Nitrofenol | 6 | 18 | 29 | 40 | 57 |

Analiza statystyczna wyników badań metody respiracyjnej (tab.2) wykazała, że spośród badanych substancji pentachlorofenol okazał się substancją bardziej toksyczną od 4-nitrofenolu. Jego stężenie powodujące 50% inhibicję oddychania mikroorganizmów okazało się przeszło dwukrotnie niższe od wywołującego ten sam efekt stężenia 4-nitrofenolu.

Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły stwierdzić, że 4-nitrofenol i pentachlorofenol wykazywały toksyczne działanie na organizmy osadu czynnego. W przypadku 4-nitrofenolu stężenia wywołujące 50% inhibicję oznaczone analizowanymi metodami nie różniły się od siebie w sposób istotny. Wartości EC₅₀ wynosiły 57 i 56 g/m^3 , odpowiednio dla metody respiracyjnej i turbidymetrycznej, i – co należy podkreślić – były zgodne z wartościami podawanymi w piśmiennictwie [4].

Wyniki badań toksyczności pentachlorofenolu wykazały natomiast istotne różnice. Test respiracyjny wykazał, iż dawka pentachlorofenolu powodująca 50% inhibicję wynosiła 28 g/m^3 i była ona zgodna z danymi literaturowymi dla stosowanego osadu czynnego [5]. W tym samym teście stężenie powodujące inaktywację 40% mikroorganizmów było dużo mniejsze i wynosiło 11 g/m^3 , natomiast stężenie powodujące 40% inhibicję oznaczone metodą turbidymetryczną wynosiło 51 g/m^3 . Porównanie tych rezultatów wskazuje na nieprzydatność metody turbidymetrycznej w przypadku badania toksycznego wpływu pentachlorofenolu na osad czynny.

Stąd też – chcąc stosować metodę turbidymetryczną zamiennie z metodą respiracyjną – należy najpierw wykonać badania wstępne (stosując obie metody), które pozwolą ocenić jej przydatność. W przypadku niektórych substancji metoda ta może się bowiem okazać wiarygodna, czego dowodem jest oznaczenie EC₅₀ dla 4-nitrofenolu, dla innych natomiast może być nieprzydatna.

Badania zostały przeprowadzone w Danii (Technical University of Denmark) w ramach programu TEMPUS SJEP nr 4988-94/3 [6].

LITERATURA

1. OECD guideline for testing of chemicals 209. Activated sludge respiration inhibition test. OECD 1984.
2. M. LESZCZYŃSKA, J. A. OLESZKIEWICZ: Application of the fluoresceine diacetate hydrolysis as an acute toxicity test. Environmental Technology, 1996, Vol. 17, pp. 79–85.
3. U. J. STROTMANN, H. EGLASAER, U. PAGGA: Development and evaluation of growth inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. Chemosphere, 1994, 28, No. 4, pp. 755–766.

4. W. J. LYMAN, W. F. REEHL, D. H. ROSENBLATT: American Chemical Society, Washington 1990.
5. A. BAUM, F. INGERSLEV: Evaluering af bionedbrydelighedstests. Eksamenprojekt udført på Laboratoriet for Okologi og Miljøloere, Danmarks Tekniske Højskole Lyngby, 1994.
6. A. GRZYBEK: Evaluation of a growth inhibition test and respiration inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. Department of Environmental Engineering, Technical University of Denmark, 1995.

On the Usefulness of the Turbidimetric Method and the Respiration Test in Assessing the Toxic Effect of Phenols on the Activated Sludge

The toxic effect of some chemical compounds on activated-sludge bacteria was measured by two methods – turbidimetry and respiration inhibition test (OECD 209). In the turbidimetric method (proposed by Strotmann, 1994), biomass concentration is measured in terms of optical density, whereas the toxic effect exerted by the chemical species is calculated in terms of the estimated inhibition of biomass growth as a function of absorbance. In the respiration inhibition test, bacterial growth is measured in terms of oxygen uptake by the biomass. To calculate the inhibiting effect of the chemical compound tested use is made of the rate of oxygen uptake. In the study reported here both the methods were used to determine the inhibiting effect of two substances – pentachlorophenol and 4-nitrophenol. Their toxic-

city was defined as EC_{50} (median effect concentration), a parameter calculated from the dose-response curve (with absorbance and oxygen uptake as a function of toxin dose), using the statistical computer program IC_p , version 2.0 (1993). The toxicity of 4-nitrophenol determined by the turbidimetric method did only slightly differ from the one established in the respiration inhibition test ($EC_{50}=56$ mg/l and $EC_{50}=57$ mg/l, respectively). For pentachlorophenol, however, the difference in the toxicity levels between the two methods was quite distinct. Our study substantiated the usefulness of the turbidimetric method in testing chemicals for toxicity, but its application requires preliminary tests involving both methods in order to find out if the results are comparable.