

prof. dr inż. Adam Solski
mgr Anna Lebiecka
mgr inż. Krystyna Białoborska

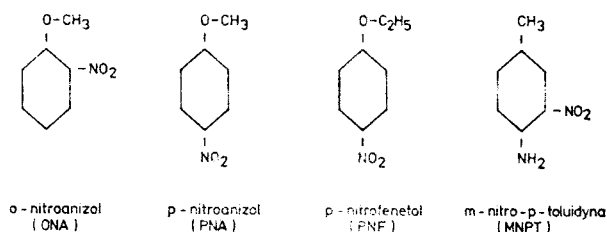
Zakład Badania Jakości Zasobów Wodnych
Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej
Oddział we Wrocławiu

OCENA STOPNIA ZAGROŻENIA BIOCENOZY WODNEJ PRZEZ KILKA ZWIĄZKÓW NITROWYCH NA PODSTAWIE BADAŃ NAD ICH TOKSYCZNOŚCIĄ I BIODEGRADACJĄ

Stosowane w wielu dziedzinach technologii organicznej aromatyczne związki nitrowe z powodu znacznej toksyczności i oporności na biochemiczny rozkład [5, 7] należą do najbardziej uciążliwych w gospodarce wodno-ściekowej, produkujących je zakładów. Do wód powierzchniowych dostają się ze ściekami przemysłowymi oraz jako środki ochrony roślin [4]. Celowym zatem było określenie ich zagrożenia dla środowiska wodnego.

Po wstępnym przebadaniu kilkunastu związków, uzyskanych z zakładów przemysłowych za pośrednictwem Biura Projektów Gospodarki Wodnej i Ściekowej „Biprowod” w Warszawie, wybrano cztery substancje występujące w ściekach przemysłowych, które ze względu na swą toksyczność mogą zagrażać biocenozie wodnej. Przeprowadzone badania wybranych nitrozwiązków: o-nitroanizolu, p-nitroanizolu, p-nitrofenetolu i m-nitro-p-toluidyny obejmowały określenie ich stopnia toksyczności i biochemicznej trwałości w środowisku wodnym. Otrzymane próbki nitrozwiązków były produktami technicznymi. Czysty o-nitroanizol uzyskano przez wielokrotne przemywanie wodą destylowaną, natomiast pozostałe związki przez krystalizację z metanolu.

Wzory strukturalne badanych związków przedstawiają się następująco:



Wyniki badań toksykologicznych

W badaniach nad toksycznością nitrozwiązków uwzględniono jako organizmy testowe:

rośliny — glon *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb, rzęsa drobna (*Lemna minor* L.)

zwierzęta — rozwielitka duża (*Daphnia magna* Strauss), kielż zdrojowy (*Gammarus pulex* L.), gupik (*Lebistes reticulatus* Peters), karp (*Cyprinus carpio* L.)

bakterie — *Pseudomonas fluorescens*

Stopień toksyczności nitrozwiązków dla organizmów roślinnych oceniano na podstawie pomiarów reprodukcji, przyrostu biomasy i zawartości w niej chlorofilu oraz asymilacji i dysymilacji [9].

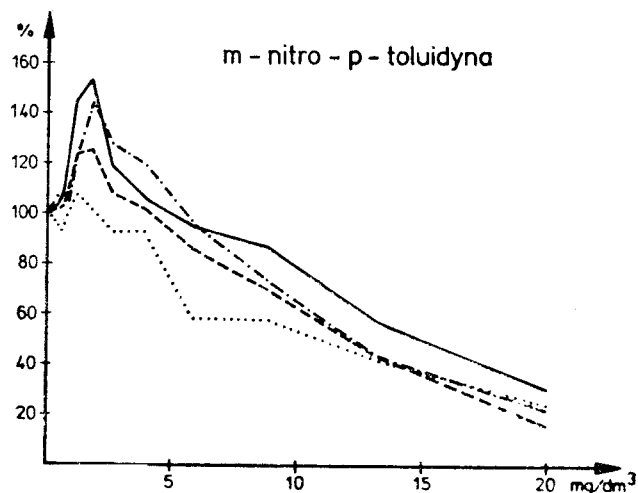
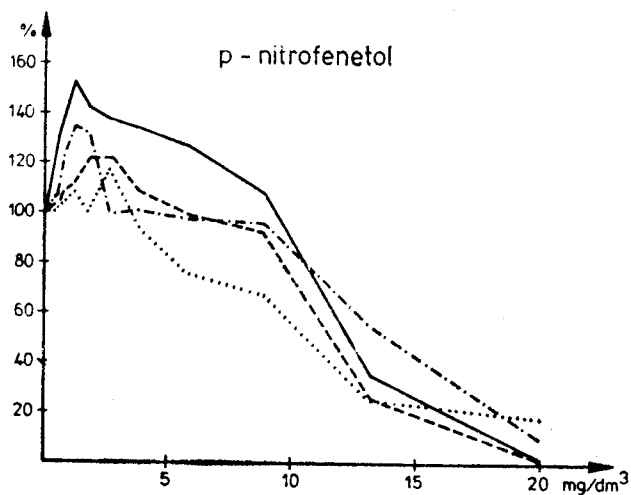
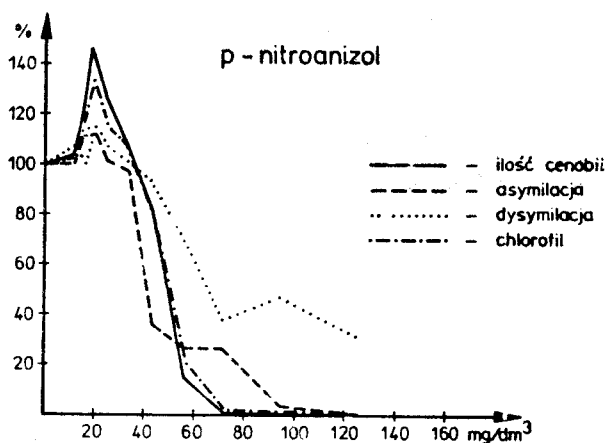
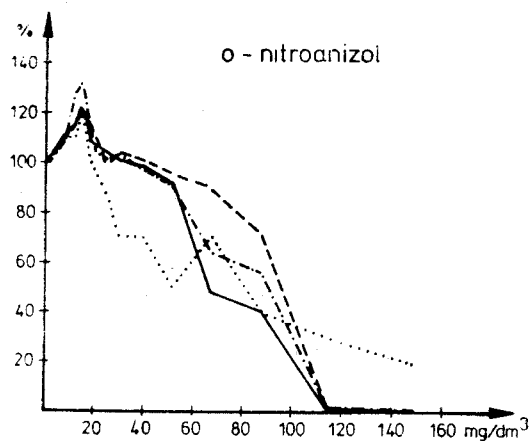
Wpływ badanych substancji na glon *Scenedesmus quadricauda* i rzęsę drobną przedstawiono na rys. 1 i 2. Stężenia nitrozwiązków: o-nitroanizolu do 20 mg/dm³, p-nitroanizolu do 33 mg/dm³, p-nitrofenetolu 0,5—5,9 mg/dm³ i m-nitro-p-toluidyny 0,5—3,9 mg/dm³, stymulowały rozwój plonu *Scenedesmus quadricauda*. Podobne działanie badanych substancji stwierdzono w doświadczeniach z rzęsą drobną (rys. 2). Z przebiegu krzywych zmian liczebności roślin, ich biomasy i pozostałych wskaźników określono wartości stężeń granicznych*) i letalnych**) (tab. 1).

Tabela 1
WYNIKI BADAŃ NAD WPŁYWEM NITROZWIĄZKÓW NA GŁON
SCENEDESMUS QUADRICAUDA I RZĘSĘ DROBNĄ (*LEMNA MINOR*)

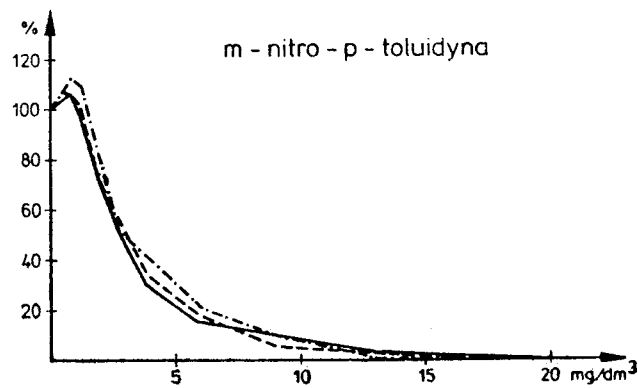
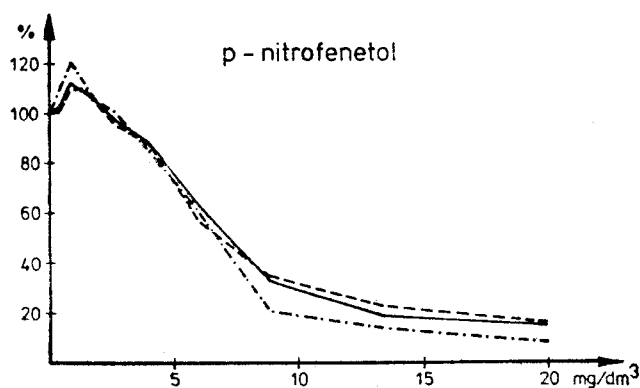
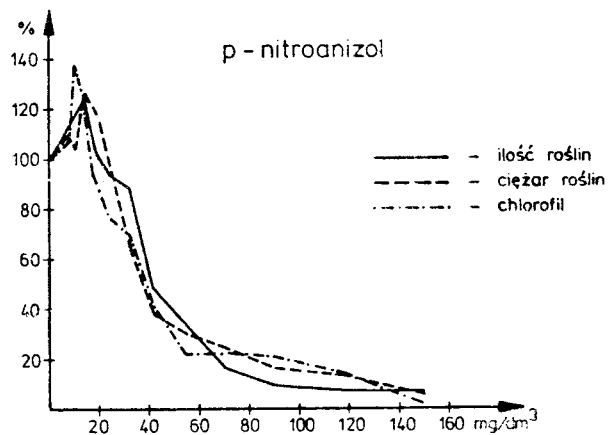
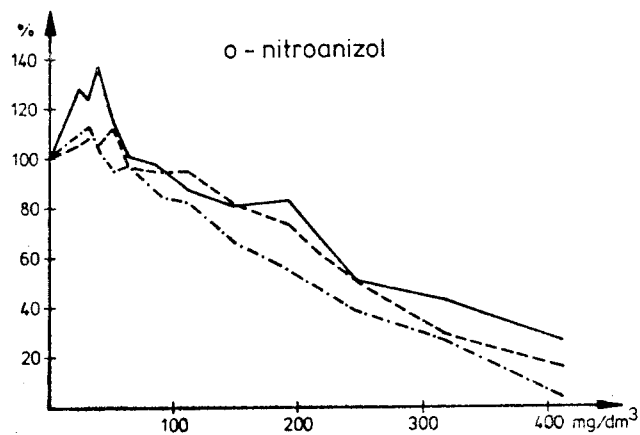
Substancja	Stężenie graniczne mg/dm ³		Stężenie letalne mg/dm ³	
	S. quadri- cauda	L. minor	S. quadri- cauda	L. minor
o-nitroanizol	40	46	113	400
p-nitroanizol	23	20	94	140
p-nitrofenetol	5,9	2,5	20	20
m-nitro-p-toluidyna	4,0	1,0	20	15—20

*) Stężenie graniczne — oznacza najwyższe stężenie, które w określonych warunkach i czasie nie wywołuje u organizmów testowych (dot. roślin i zwierząt) żadnych ujemnych zmian.

**) Stężenie letalne — oznacza stężenie powodujące śmierć roślin.



Rys. 1 Wpływ nitrozwiązków na przyrost liczebności ctenofor, asymilację i dysymilację oraz zawartość chlorofilu w hodowlach *Scenedesmus quadricauda*



Rys. 2 Wpływ nitrozwiązków na reprodukcję, przyrost biomasy i zawartość chlorofilu w hodowlach *Lemna minor*

Przyjmując wartości stężeń granicznych jako podstawowe kryterium toksyczności, za bardziej wrażliwy organizm testowy należy uznać rzęsę drobną.

Wpływ toksyczny badanych nitrozwiązków na zwierzęta oceniano dokonując zapisów porażen i śmierci oraz wyznaczając wartości stężeń granicznych, stężeń progowych*) i LC50/48**) [9]. Wyniki badań ze zwierzętami przedstawiono w tabeli 2. Stwierdzono, że najbardziej wrażliwym gatunkiem w grupie zwierząt testowych była rozwielitka duża (*Daphnia magna*), zaś najmniej wrażliwość wykazywał gupik (*Lebistes reticulatus*).

Wpływ badanych substancji na bakterie oceniano na podstawie doświadczeń z gatunkiem *Pseudomonas fluorescens*. W zastosowanym do

badan o- i p-nitroanizolu tęście, stopień toksyczności określano na podstawie hamowania rozkładu glukozy przez bakterie i tworzenia kwasów organicznych [1].

W trzech kolejnych próbach stwierdzono, że nasycony roztwór o-nitroanizolu o stężeniu około 1800 mg/dm³ nie wykazywał toksycznego działania na *Pseudomonas fluorescens*. Stężenie p-nitroanizolu 450 mg/dm³ również nie hamowało zdolności bakterii do tworzenia kwasów. W badaniach p-nitrofenetolu zastosowano test MIC (Minimal Inhibitory Concentration), określający tzw. minimalne stężenie inhibitujące [2]. Stwierdzono, że najniższym stężeniem hamującym rozwój bakterii *Pseudomonas fluorescens* była wartość 13,4 mg/dm³. Z kolei najmniejszym stężeniem, które wykazało toksyczne działanie m-nitro-p-toluidyny było 14,1 mg/dm³.

Tabela 2

TOKSYCZNOŚĆ BADANYCH NITROZWIĄZKÓW DLA WYBRANYCH ZWIERZĄT WODNYCH

Organizm testowy	Stężenie charakterystyczne	O-nitroanizol mg/dm ³	p-nitroanizol mg/dm ³	p-nitrofenetol mg/dm ³	m-nitro-p-toluidyna mg/dm ³
<i>Daphnia magna</i> rozwielitka duża	stęż. graniczne	19,9	12,4	4,5	2,2
	stęż. progowe	22,9	14,2	5,4	2,7
	LC 50/48	31,3	22,9	9,3	5,1
<i>Gammarus pulex</i> kieleż zdrojowy	stęż. graniczne	18,6	14,2	—	—
	stęż. progowe	22,3	16,3	—	—
	LC 50/48	32,5	43,2	—	—
<i>Lebistes reticulatus</i> gupik	stęż. graniczne	19,4	19,4	10,8	6,4
	stęż. progowe	23,3	23,3	14,0	8,3
	LC 50/48	81,3	70,0	29,5	18,6
<i>Cyprinus carpio</i> karp	stęż. graniczne	—	—	4,7	3,6
	stęż. progowe	—	—	5,6	4,7
	LC 50/48	—	—	24,3	18,4

Wyniki badań nad biochemiczną trwałością nitrozwiązków

Badania wstępne wykazały, że o- i p-nitroanizol oraz p-nitrofenetol i m-nitro-p-toluidyna nie ulegały rozkładowi w środowisku wodnym, pozbawionym mikroorganizmów, jak również nie stwierdzono wpływu światła na ich chemiczną trwałość. Podatność czterech wybranych nitrozwiązków na biochemiczny rozkład badano, stosując metody symulujące warunki, występujące przy biologicznym oczyszczaniu ścieków (komora z osadem czynnym) oraz warunki występujące w wodach naturalnych (model z wodą rzeczną i model ekosystemu wodnego).

Na podstawie wykonanych w sapromacie pomiarów przebiegu respiracji osadu czynnego pod wpływem nitrozwiązków określono tzw.

stężenie toksyczne (hamujące w 50% respirację osadu), a następnie wyznaczono wielkości ich stężeń w komorach z osadem czynnym (tab. 3).

Tabela 3
WARTOŚCI STĘŻEŃ NITROZWIĄZKÓW ZASTOSOWANE W KOMORACH OSADU CZYNNEGO

Substancja	Stężenie toksyczne mg/dm ³	Stężenie w komorach mg/dm ³		
		1	2	3
o-nitroanizol	150	37,5	75,0	112,5
p-nitroanizol	75	18,7	37,5	56,2
p-nitrofenetol	40	10,0	20,0	30,0
m-nitro-p-toluidyna	28	7,0	14,0	21,0

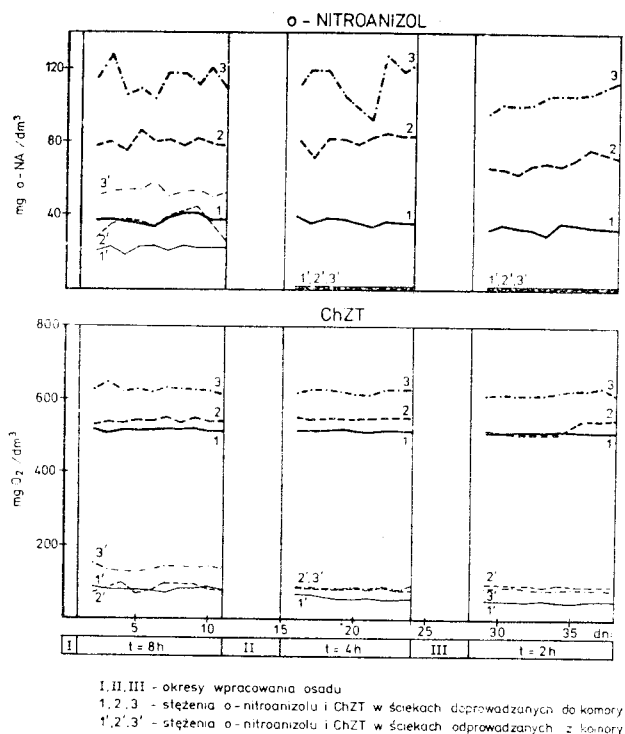
Przebieg zmian stężeń badanych nitrozwiązków oraz ChZT w ściekach, doprowadzanych i odprowadzanych z komór w zależności od ładunku tych związków i czasu zatrzymania ścieków, przedstawiono na rys. 3—6.

W komorach, w których czas zatrzymania ścieków wynosił 8 godz., a zatem obciążenie ładunkiem badanej substancji było najniższe, obserwowano, za wyjątkiem p-nitrofenetolu, znacznie niższy procent usuwania związków nitrowych niż przy 2 i 4-krotnie wyższym obciąże-

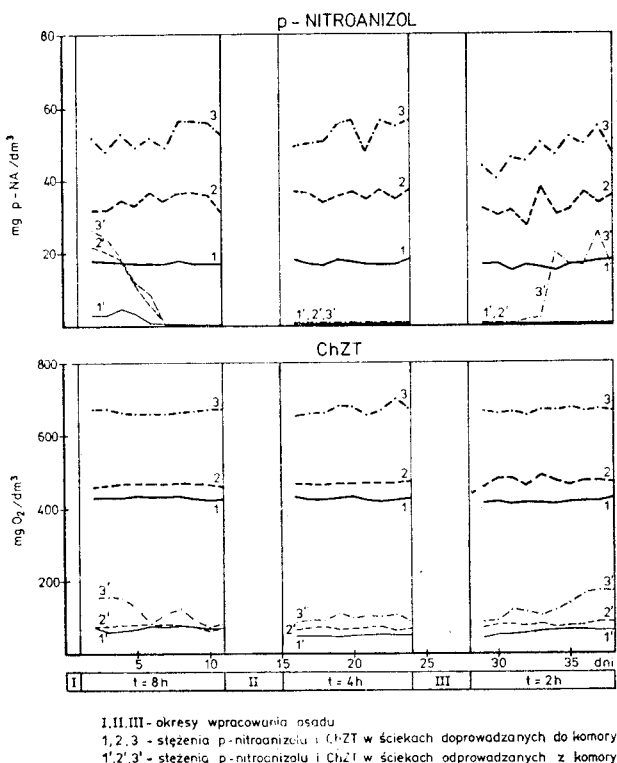
*) Stężenie progowe — oznacza najniższe stężenie, które w określonych warunkach i czasie wywołuje u zwierząt testowych pierwsze niekorzystne zmiany (zmniejszona wrażliwość na bodźce zewnętrzne, zanępokojenie, utrata równowagi itp.).

**) LC50/48 — oznacza stężenie powodujące śmierć 50% zwierząt testowych po 48 godz. ekspozycji w roztworach badanej substancji.

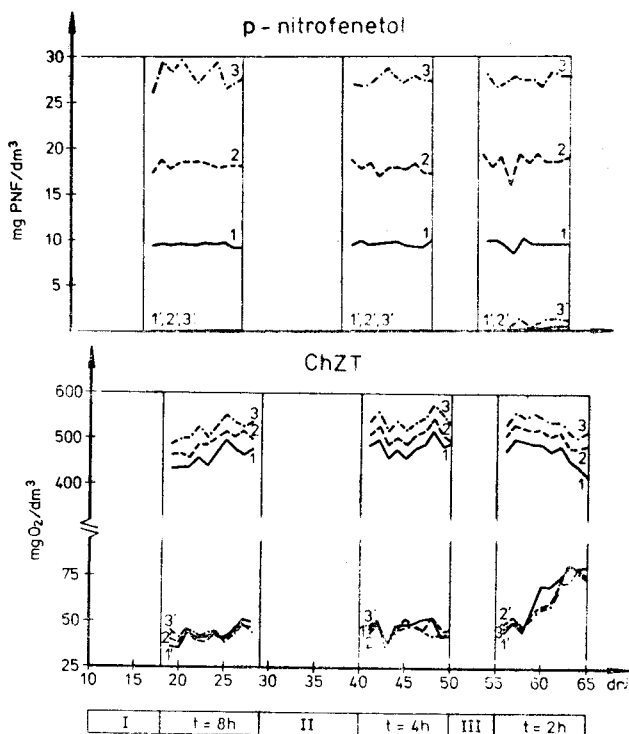
niu komór i odpowiednio 2 i 4-krotnie krótszym czasie zatrzymania ścieków. Wynikało to z niepełnej jeszcze adaptacji mikroorganizmów do rozkładu nitro związków i okres ten należy przyjąć jako czas wpracowania osadu.



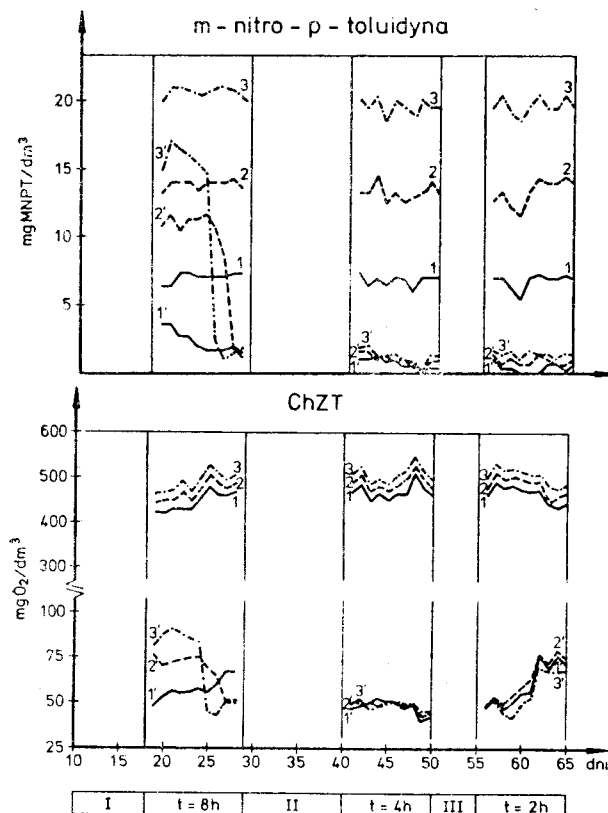
Rys. 3 Zmiany stężeń o-nitroanizolu i ChZT w ściekach syntetycznych doprowadzanych z komory w zależności od ładunku badanej substancji i czasu zatrzymania ścieków



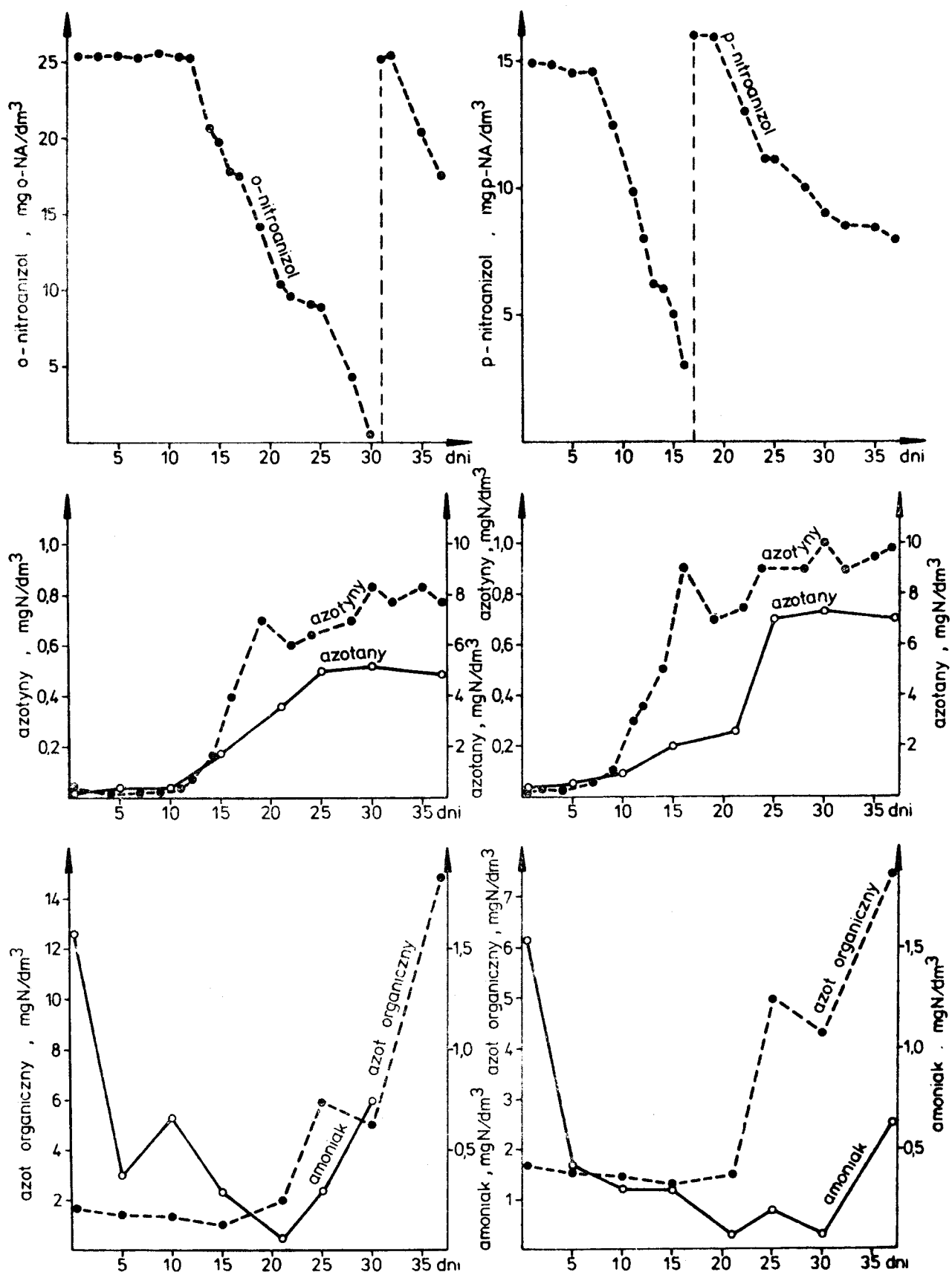
Rys. 4 Zmiany stężeń p-nitroanizolu i ChZT w ściekach syntetycznych doprowadzanych i odprowadzanych z komory w zależności od ładunku badanej substancji i czasu zatrzymania ścieków



Rys. 5 Zmiany stężeń p-nitrofenetolu i ChZT w ściekach syntetycznych doprowadzanych i odprowadzanych z komory w zależności od ładunku PNF i czasu zatrzymania ścieków



Rys. 6 Zmiany stężeń m-nitro-p-toluidyny i ChZT w ściekach syntetycznych doprowadzanych i odprowadzanych z komory w zależności od ładunku MNPT i czasu zatrzymania ścieków



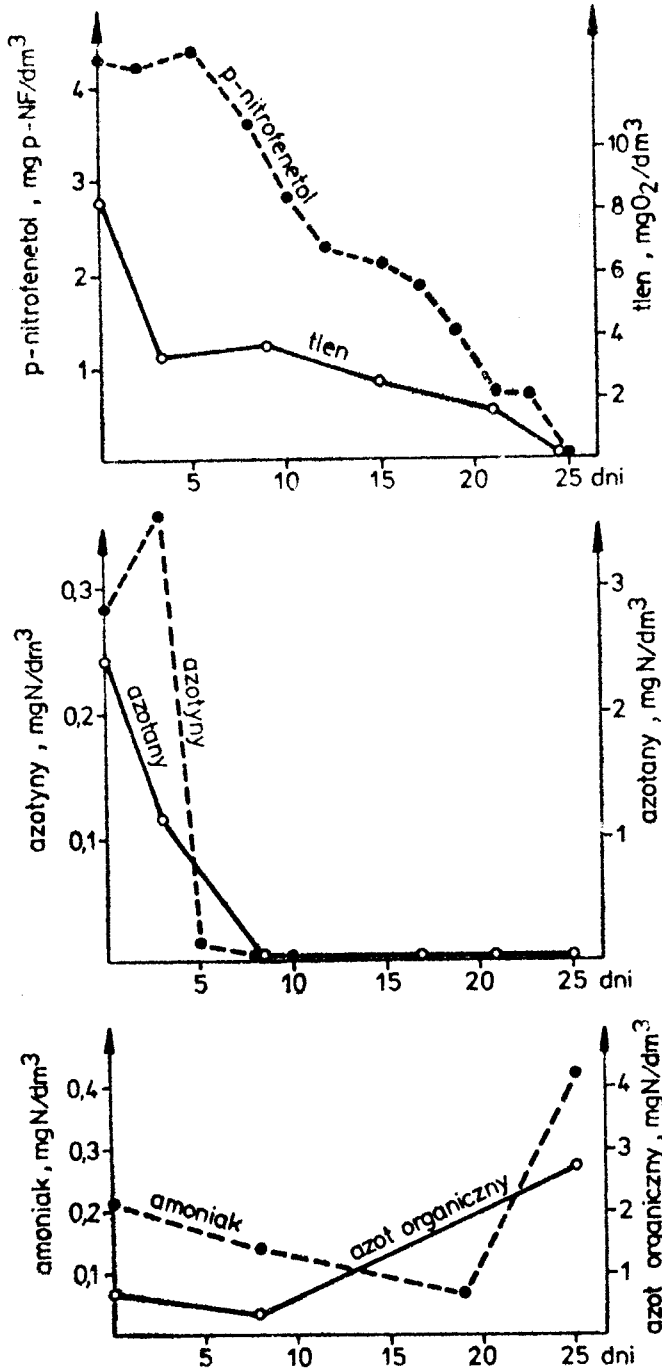
Rys. 7 Rozkład o-nitroanizolu w wodzie rzecznej na tle zmian zawartości związków azotowych

Wyniki badań, charakteryzujące podatność badanych związków na bakteryjny rozkład w komorze z osadem czynnym, przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

ROZKŁAD BADANYCH NITROZWIĄZKÓW W KOMORZE OSADU CZYNNEGO		
Substancja	% usuwania	obciążenie komory mg/dm ³ /h
o-nitroanizol	100	poniżej 55
p-nitroanizol	100	poniżej 20
p-nitrofenetol	100	poniżej 10
m-nitro-p-toluidyna	ok. 90	poniżej 7

Najbardziej podatnym na biodegradację okazał się o-nitroanizol, a największą oporność stwierdzono w przypadku m-nitro-p-toluidyny.



Rys. 8 Rozkład p-nitrofenetolu i m-nitro-p-toluidyny w wodzie rzecznej na tle zmian zawartości związków azotowych

Rozkład nitrozwiązków w modelu rzeki badano, używając wody z rzeki Oławy, której skład chemiczny odpowiadał II klasie czystości wód. Przebieg biodegradacji związków nitrowych kontrolowano na tle zmian pH, zawartości amono-

Tabela 5

ROZKŁAD NITROZWIĄZKÓW W MODELU RZECI					
Substancja	Stężenie mg/dm ³	kolejność dowek			
		1		2	
		V	t	V	t
o-nitroanizol	25	0,050	12	0,050	2
p-nitroanizol	15	0,050	7	0,030	2
p-nitrofenetol	5	0,010	4	0,014	2
m-nitro-p-toluidyna	5	0,002	37	—	—

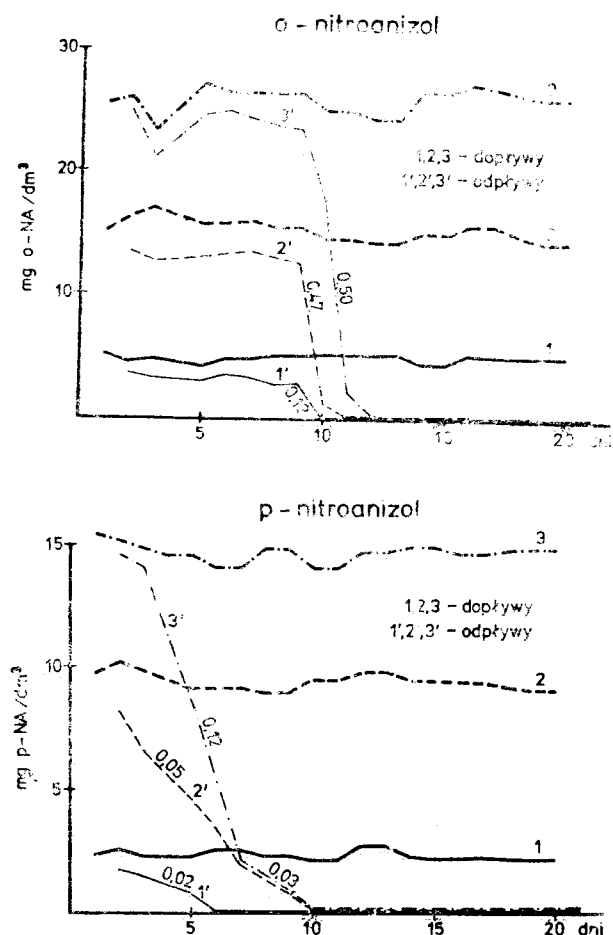
v — mg/dm³/h; t — doby

niaku, azotynów, azotanów i azotu organicznego (rys. 7, 8). Podatność badanych związków na biochemiczny rozkład oceniano na podstawie parametrów: predkości rozkładu (v) i czasu hamowania (t).

Z przedstawionych w tabeli 5 danych wynika, że najmniejszą oporność na działanie mikroorganizmów wykazał o-nitroanizol, zaś największą m-nitro-p-toluidyna.

Rozkład związków nitrowych w modelu ekosystemu śledzono w akwariach przepływowych, zasiedlonych odpowiednimi gatunkami roślin i zwierząt wodnych [8]. Podstawą przyjętych do badań wielkości stężeń roztworów wodnych nitrozwiązków w akwariach były wartości stężeń dopuszczalnych, wyznaczonych na podstawie badań toksykologicznych.

Przebieg zmian stężeń związków nitrowych w wodach dopływających i odpływających z akwariów przedstawiono na rys. 9 i 10.

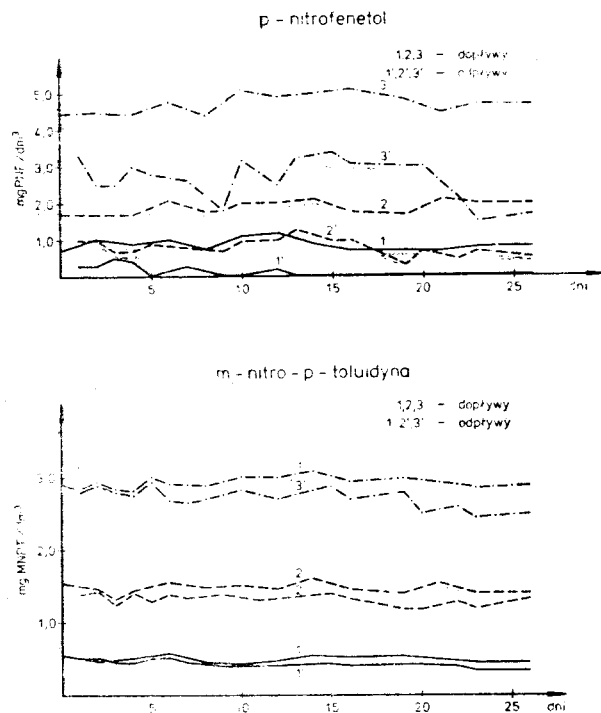


Rys. 9 Zmiany zawartości o-nitroanizolu i p-nitroanizolu w wodach dopływających i odpływających z akwariów

Tabela 6

ROZKŁAD ZWIĄZKÓW NITROWYCH W MODELU EKOSYSTEMU

Substancja	Stężenie mg/dm ³	V mg/dm ³ /h	t doby
o-nitroanizol	15	0,47	8
p-nitroanizol	15	0,12	2
p-nitrofenetol	5	0,012	20–25
m-nitro-p-toluidyna	3	0,0007	4–23



Rys. 10 Zmiany zawartości p-nitrofenetolu i m-nitro-p-toluidyny w wodach dopływających i odpływających z akwariów

Procesy rozkładu tych związków w modelu ekosystemu określają między innymi parametry: predkość rozkładu (v) i czasu hamowania (t), przedstawiono w tabeli 6.

Podatność nitrozwiązków na biochemiczny rozkład w modelu ekosystemu była podobnie jak w testach z osadem czynnym i wodą rzeczną najwyższą dla o-nitroanizolu, a najniższą dla m-nitro-p-toluidyny.

Podsumowanie

Wyniki badań nad toksycznością nitrozwiązków dla organizmów wodnych wyrażone stężeniami granicznymi, progowymi i LC 50/48 przedstawiono w tabeli 7.

Najbardziej trującą dla organizmów wodnych substancją była m-nitro-p-toluidyna, a następnie p-nitrofenetol. Kilkakrotnie słabsze działanie toksyczne wykazywał p-nitroanizol, a najmniej trujący dla przedstawicieli biocenozy wodnej okazał się o-nitroanizol.

Oceniając stopień toksyczności badanych nitrozwiązków, według skali Daughertyego [3] i Liebmann [6], zaliczono je do trucizn: silnie toksycznych (m-nitro-p-toluidyna i p-nitrofenetol) i umiarkowanie toksycznych (o-nitroanizol i p-nitroanizol).

Największą oporność na toksyczne działanie nitrozwiązków wykazywał przedstawiciel bakterii — *Pseudomonas fluorescens*. Stosunkowo dużą wrażliwość stwierdzono u rzęsy. Spośród zwierząt, najbardziej czułym gatunkiem była rozwielitka, stąd uznano ją za organizm wskaźnikowy. Zgodnie z przyjętymi zasadami, mno-

STOPIEŃ TOKSYCZNOŚCI BADANYCH NITROZWIĄZKÓW DLA ORGANIZMÓW WODNYCH ORAZ DOPUSZCZALNE STĘŻENIA TYCH SUBSTANCJI

Organizm testowy	O-nitroanizol mg/dm ³			p-nitroanizol mg/dm ³			p-nitrofenetol mg/dm ³			m-nitro-toluidyna mg/dm ³		
	stężenie		LC 50/48	stężenie		LC 50/48	stężenie		LC 50/48	stężenie		LC 50/48
	graniczne	progowe		graniczne	progowe		graniczne	progowe		graniczne	progowe	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1800	—	—	450,0	—	—	13,4	—	—	14,0	—	—
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	40,0	—	—	33,0	—	—	5,9	—	—	3,9	—	—
<i>Lemna minor</i>	86,0	—	—	20,0	—	—	2,6	—	—	1,2	—	—
<i>Daphnia magna</i>	19,9	22,9	51,3	12,4	14,2	22,9	4,5	5,4	9,3	2,2	2,7	5,1
<i>Gammarus pulex</i>	18,6	22,3	52,5	14,2	16,3	43,2	—	—	—	—	—	—
<i>Lebistes reticulatus</i>	19,4	23,3	81,3	19,4	23,3	70,0	10,8	14,0	29,5	6,4	8,3	18,6
<i>Cyprinus carpio</i>	—	—	—	—	—	—	4,7	5,6	24,3	3,6	4,7	18,4
Stężenie dopuszczalne	5,1			2,3			0,934			0,513		

ząc LC 50/48, ustalone dla organizmu wskaźnikowego przez odpowiedni współczynnik bezpieczeństwa, obliczono stężenia dopuszczalne badanych nitrozwiązków.

Podstawą przyjęcia wielkości tego współczynnika były propozycje U.S. National Technical Advisory Committee [10] oraz wyniki testów, określające niektóre toksykodynamiczne właściwości substancji. Dla wszystkich badanych nitrozwiązków przyjęto współczynnik bezpieczeństwa = 0,1. Wyznaczone w ten sposób stężenia dopuszczalne wynoszą:

o-nitroanizol	5,1 mg/dm ³
p-nitroanizol	2,3 mg/dm ³
p-nitrofenetol	0,93 mg/dm ³
m-nitro-p-toluidyna	0,51 mg/dm ³

Przedstawione wielkości dopuszczalnych stężeń czterech badanych nitrozwiązków należy przyjąć jako propozycje. Próby sprawdzenia tych wielkości w modelu ekosystemu wykazały, że zastosowany model wymaga wprowadzenia usprawnień i nowych rozwiązań technicznych. W pełni powiodły się jedynie doświadczenia z o- i p-nitroanizolem, a uzyskane wyniki potwierdziły nieszkodliwość dla organizmów wodnych stężeń, uznanych za dopuszczalne.

O zagrożeniu, jakie stanowią dla biocenozy badane związki nitrowe, decyduje przede wszystkim ich toksyczność oraz biochemiczna trwałość.

Z porównania biochemicznego rozkładu nitrozwiązków we wszystkich przeprowadzonych testach wynika, że oporność badanych substancji na biodegradację wzrastała kolejno od o-nitroanizolu poprzez p-nitroanizol i p-nitrofenetol do m-nitro-p-toluidyny. Na podkreśle-

nie zasługuje fakt, że kolejność ta układała się zgodnie ze wzrostem ich toksyczności dla środowiska wodnego.

LITERATURA

1. Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung Band II, Biologische, Mikrobiologische, und Toxikologische Methoden, Veb Gustav Fischer Verlag Jena, 1970.
2. J. CURRY, J. GREENBERG: Filament formation in radioresistant mutants of *Escherichia coli* S after treatment with ultraviolet light and radio-mimetic agents. *J. of Bacteriol.* vol. 83, 38—12, 1962.
3. F. M. DAUGHERTY: Effects of some chemical used in well drilling on marine animals. *Sew. a. Ind. Wastes*, 23, s. 1282—1287, 1951.
4. R. GERMANIER, K. WUHRMANN: Über den aeroben mikrobiellen Abbau aromatischer Nitroverbindungen. *Path Microbiol.* 26, 569—578, 1963.
5. B. GOMÓŁKA: Podatność benzenu i pirydyny na biochemiczny rozkład w procesie osadu czynnego. Praca doktorska wyk. w Inst. Ochr. Środowiska Pol. Wrocław, 1978 (komunikat nr 496).
6. M. LIEBMANN: *Handbuch der Frischwasser und Abwasserbiologie* Bd 2 München und Jena, 1960.
7. F. J. LUDZAK, M. V. ETTINGER: Chemical structures resistant to aerobic biochemical stabilization. *J. Water Pollut.*, 32, 1963, 1173.
8. **Praca zbiorowa** — Przebadanie różnych metod i ujednolicenie metod pomiaru biodegradacji IMGW, Gdańsk, 1977.
9. A. SOLSKI: Metodyka badań biotoksykologicznych w środowisku wodnym. IMGW Wrocław. Maszynopis, 1977.
10. U.S. Technical Advisory Committee: Report of National Techn. Adv. Com. on Water Quality Criteria of the Secretary of the Interior., U.S. Fed. Wat. Pollut. Centr. Adm. Wash. D.C. 1—234, 1968.