

OCENA EKOTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH ZAWARTYCH W ŚCIEKACH WŁÓKIENNICZYCH

STANISŁAW LEDAKOWICZ, TERESA JAMROZ, BARBARA SENCIO

Politechnika Łódzka, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, ul. Wólczańska 213, 93-005 Łódź

Keywords: toxicity of textile wastewater, bioindicators.

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF ORGANIC COMPONENTS CONTAINED IN TEXTILE WASTEWATER

The results of ecotoxicological investigation of chosen components of textile wastewater have been presented. There were two detergents Awiważ and Tetrapol and one anthraquinone dyestuff. The toxicity of the compounds were checked by means of microbiological methods with the use of bacterial strains. In the case of pure cultures (*Vibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) the values of effective concentration EC_{50} were found to be almost the same for a given compound with the use of various bacteria. Application of the test with mixed cultures from activated sludge gave different results in EC_{50} for the investigated dyestuff.

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań toksyczności wybranych składników ścieków włókienniczych. Były to detergenty Awiważ i Tetrapol oraz barwnik antrachinonowy. Toksyczność związków sprawdzano metodami mikrobiologicznymi z udziałem bakterii. W przypadku stosowania czystych kultur (*Vibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) uzyskano zbliżone wartości stężeń EC_{50} dla każdego z testowanych związków. Zastosowanie testu inhibicji z udziałem kultur mieszanych pochodzących z osadu czynnego wykazało rozbieżność uzyskanej oceny w przypadku barwnika.

WPROWADZENIE

Rosnące zagrożenie skażenia wód powierzchniowych stało się nagłą przyczyną podjęcia intensywnych badań dotyczących zmniejszenia skutków zrzutów substancji trujących do środowiska. W technologiach przemysłu włókienniczego, ze względu na stosowanie wielu związków o charakterze detergentów,

barwników, rozjaśniaczy optycznych, klejonek, środków zmiękczejących, biocydów, środków wiążących jony metali, problem trujących ścieków przemysłowych jest szczególnie ważny. Inhibujące oddziaływanie tych substancji na mikroorganizmy może w znacznym stopniu powodować zakłócenie procesu biologicznego oczyszczania ścieków, ponieważ znaczna ich część nie ulega biodegradacji. Skuteczne metody fizyko-chemicznego rozkładu trudno degradowalnych substancji nie zawsze prowadzą do powstania związków przyjaznych dla środowiska, bowiem często wykazują one również niszczące działanie w stosunku do organizmów żywych.

Oznaczenia chemiczne pozwalające na dokładne określenie stężenia bardzo wielu związków nie mogą być jedynym wskaźnikiem oceny ich szkodliwości, ze względu na fakt, iż nie uwzględniają synergistycznych ani antagonistycznych oddziaływań w stosunku do środowiska.

Ważnym etapem w rozpoznawaniu zagrożenia życia biologicznego danego ekosystemu są prowadzone na coraz większą skalę badania toksykologiczne. Pozwalają one ocenić szkodliwość pojedynczych związków chemicznych oraz ich mieszanin w stosunku do żywych organizmów. Wśród wielu nowo opracowywanych metod badań toksykologicznych coraz większe zastosowanie znajdują metody wykorzystujące szybkie testy zastępujące długookresowe testy chroniczne.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania toksyczności stosowanych w włókiennictwie substancji barwnych i powierzchniowo czynnych nowymi i klasycznymi testami mikrobiologicznymi.

METODYKA BADAŃ

Przykładem badanych związków organicznych występujących w ściekach włókienniczych były następujące preparaty handlowe:

1. Błękit alizarynowy kwasowy 2G (Acid blue 40) – barwnik antrachinowy.

2. Awiważ KG – detergent anionowy, mający właściwości zmiękczenia i ożywiania kolorów, pogłębiania intensywności wybarwień. Stosowany jest przy produkcji tkanin bawełnianych, lnianych, wełnianych i włókien sztucznych oraz w przemyśle skórzanym do prania skór futerkowych.

3. Tetrapol CLB – detergent anionoaktywny, mający właściwości zwilżające, pozwalające na lepsze przebarwienie tkanin nawet surowych. Stosowany jest w procesach przygotowawczych, takich jak: obgotowywanie, bielenie, napowanie, oraz w procesach prania tkanin po druku i barwienia barwnikami naftalenowymi. Dodatek detergentu do farb drukarskich, zwłaszcza kadziowych, powoduje lepszą egalizację druku oraz poprawia wnikiwość farby do włókna.

W niniejszych badaniach zastosowano szybką metodę oznaczeń za pomocą testu luminescencji oraz klasyczną metodę wysiewów, pozwalającą na określenie liczby przeżywających komórek bakteryjnych. Metoda wykorzysta-

jąca zjawisko luminescencji bakterii polegała na pomiarze przy użyciu luminometru stopnia tłumienia światła emitowanego przez żywe komórki. W tym celu stosowano liofilizaty *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, które po regeneracji pozwoliły na uzyskanie odpowiedzi w ciągu 30 min [2].

Metodę rozcieńczeń Kocha zastosowano do określenia przeżywalności bakterii Gram-ujemnego szczepu *Escherichia coli* oraz Gram-dodatniego *Bacillus subtilis* (pochodzących z kolekcji Czystych Kultur Instytutu Fermentacji i Mikrobiologii PŁ) poddanych działaniu badanych związków [1].

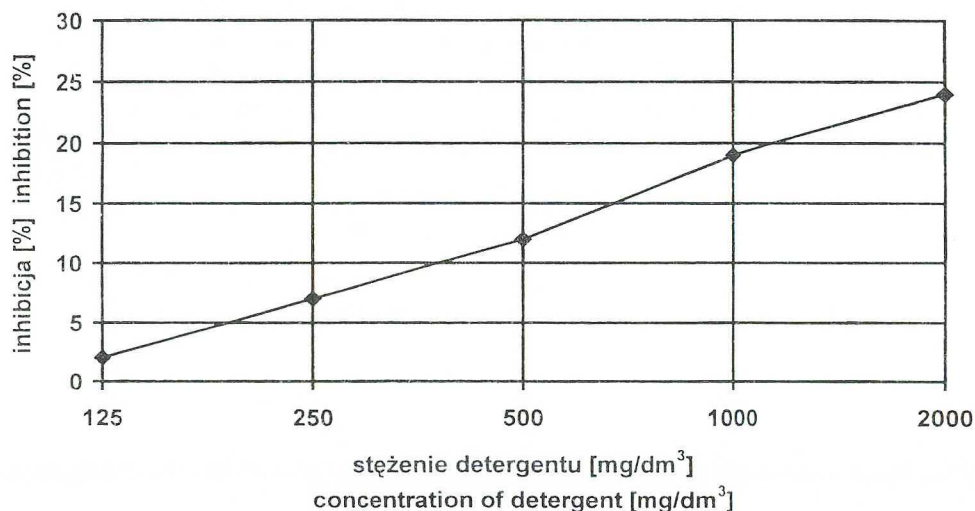
WYNIKI BADAŃ

W badaniach określających toksyczny charakter związków organicznych najczęściej wykorzystywanym modelem biologicznym są bakterie. Ze względu na krótki czas generacji tych organizmów, istnieje możliwość uzyskania stosunkowo szybkiej odpowiedzi na zmiany środowiska wywołane toksykantami. Pomiar luminescencji stanowi dogodną metodę oceny aktywności życiowej organizmów.

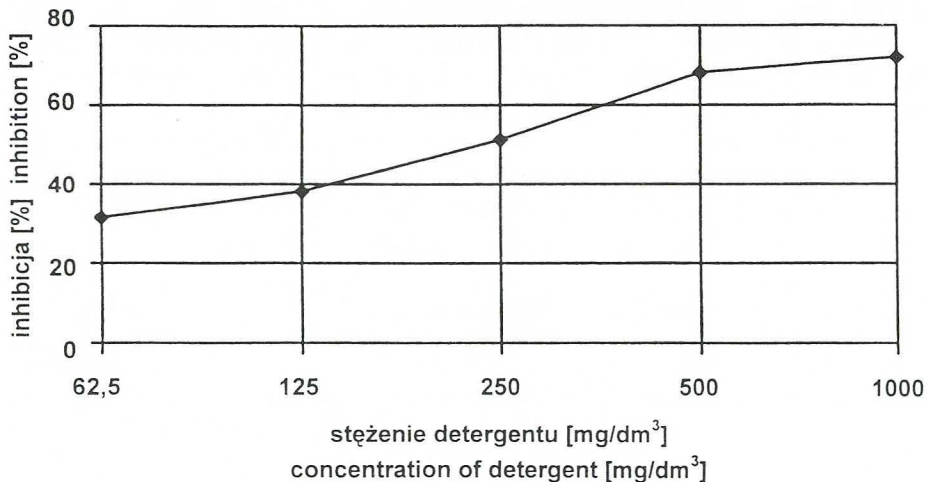
Bioluminescencja polegająca na emisji promieniowania świetlnego w wyniku reakcji biochemicznych zachodzących w żywej komórce jest procesem utleniania zredukowanego substratu w obecności tlenu przy udziale enzymu lucyferazy:



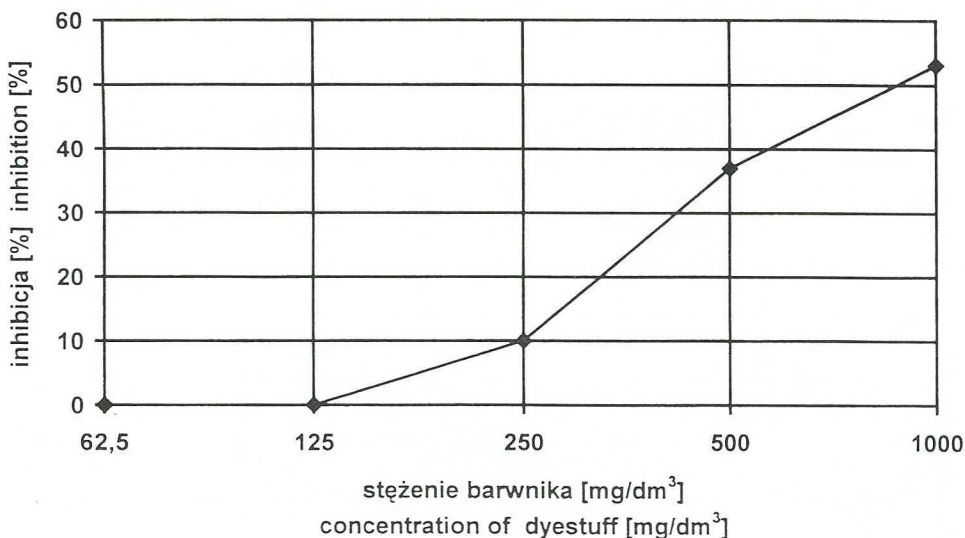
Wykorzystując możliwości oznaczeń bioluminescencji za pomocą testu ToxAlert® 10, zastosowano metodykę pomiaru tzw. stężenia efektywnego EC. Umożliwia ona wyznaczenie stężenia związku (EC_{50}) powodującego 50% redukcję w sygnale bioluminescencji w czasie wykonywania oznaczeń. Wyniki badań dla poszczególnych związków przedstawiono na rysunkach 1, 2, 3.



Rys. 1. Zależność redukcji bioluminescencji od stężenia detergentu Awivaż
Percentage reduction of bioluminescence versus concentration of detergent Awivaż



Rys. 2. Zależność redukcji bioluminescencji od stężenia detergentu Tetrapol
Percentage reduction of bioluminescence versus concentration of detergent Tetrapol

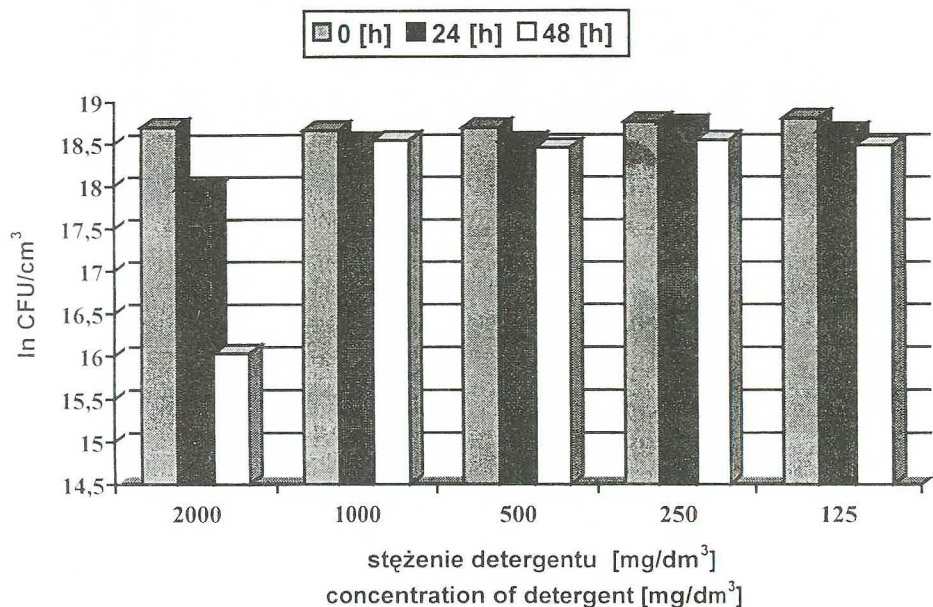


Rys. 3. Zależność redukcji bioluminescencji od stężenia barwnika Acid blue 40
Percentage reduction of bioluminescence versus concentration of dyestuff Acid blue 40

Na podstawie analiz toksyczności przeprowadzonych przy użyciu testu ToxAlert®10 stwierdzono, że badane związki charakteryzowały się różnym stopniem oddziaływania na komórki bakterii z gatunku *V. fischeri*. Najbardziej negatywnie działającym związkiem okazał się anionoaktywny detergent o nazwie handlowej Tetrapol CLB. Preparat ten już w stężeniu 248 mg/dm³ dawał 50% redukcję populacji testowych bakterii luminescencyjnych. W przypadku anionowego detergentu o nazwie handlowej Awiważ nie stwierdzono

niszczącego działania tego preparatu na szczep testowy. Przy maksymalnym z badanych stężeń, wynoszącym 2000 mg/dm^3 , uzyskano zaledwie 24% inhibicję emisji światła, odczytywaną w tym teście jako graniczna wartość bezpieczeństwa. W przypadku błękitu alizarynowego Acid blue 40, wartość EC_{50} wyniosła 907 mg/dm^3 .

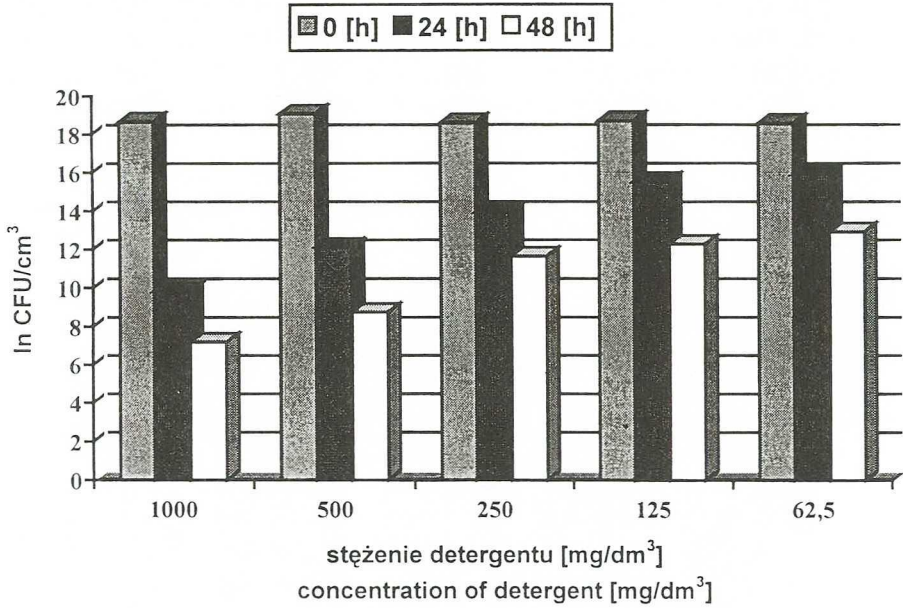
Dla porównania wyników uzyskanych na postawie szybkiego testu ToxAlert[®]10 wykonano równoległe badania metodą klasyczną z udziałem bakterii z gatunku *E. coli*. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów przedstawiono na rysunkach 4–7 i w tabelach 1–3.



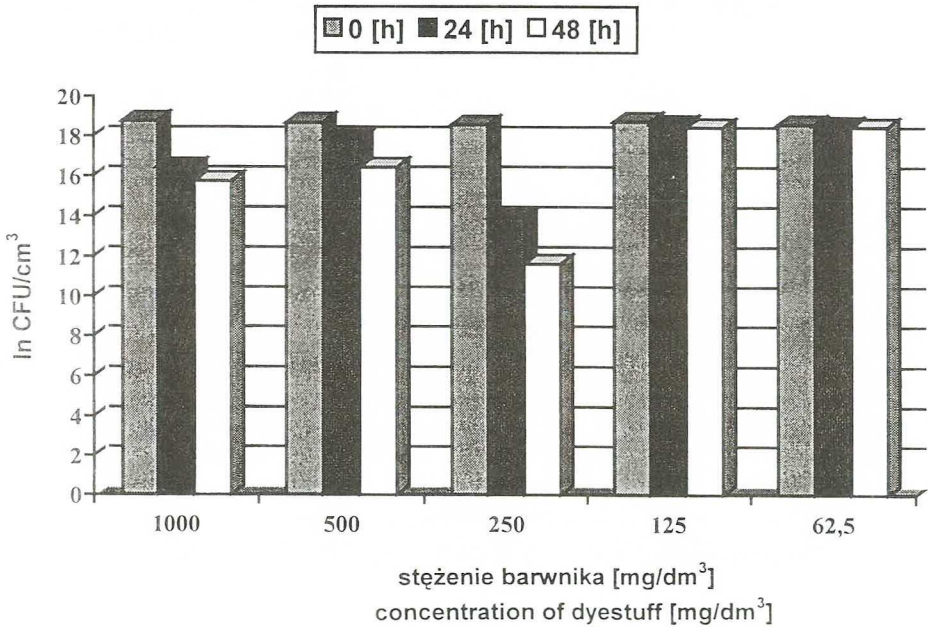
Rys. 4. Liczebność populacji *E. coli* w roztworach detergentu Awiważ
Quantity of *E. coli* population in solutions of detergent Awiważ

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badane związki w różnym stopniu wpływały na rozwój populacji modelowego szczepu *E. coli*. Roztwory anionoaktywnego detergentu Tetrapol wykazywały najbardziej inhibitoryczne działanie w stosunku do bakterii *E. coli*. Przy stężeniu 1000 mg/dm^3 związek ten powodował 61% inhibicję wzrostu, natomiast w przypadku obecności anionowego detergentu Awiważ nie stwierdzono negatywnego działania w stosunku do badanego mikroorganizmu. Związek ten w stężeniu 1000 mg/dm^3 nie hamował wzrostu *E. coli*, a dwukrotne zwiększenie jego zawartości w roztworze wywoływało tylko nieznaczną 14% zamieralność populacji szczepu.

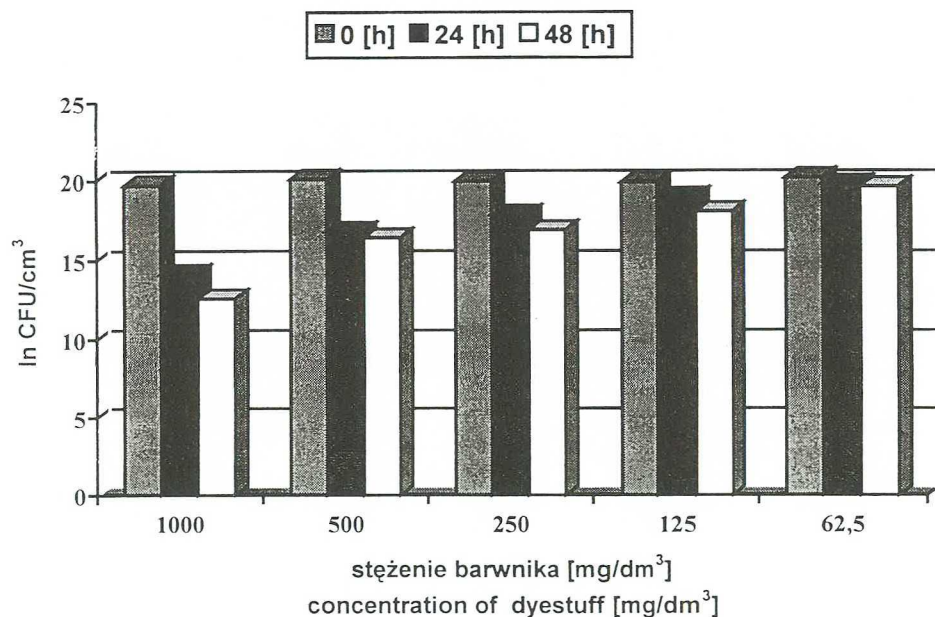
W przypadku oceny toksycznego działania barwnika antrachinonowego wprowadzono dodatkowo test z udziałem bakterii Gram-dodatnich z gatunku *B. subtilis*. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że roztwory błękitu alizarynowego nie wpływały niszcząco na komórki testowych szczepów. Przy stężeniu 1000 mg/dm^3 stwierdzono 14% obniżenie liczebności populacji *E. coli* i 36% – *B. subtilis* (Tab. 3).



Rys. 5. Liczebność populacji *E. coli* w roztworach detergentu Tetrapol
Quantity of *E. coli* population in solutions of detergent Tetrapol



Rys. 6. Liczebność populacji *E. coli* w roztworach barwnika Acid blue 40
Quantity of *E. coli* population in solutions of dyestuff Acid blue 40



Rys. 7. Liczebność populacji *B. subtilis* w roztworach barwnika Acid blue 40
Quantity of *E. coli* population in solutions of dyestuff Acid blue 40

Tabela 1. Przeżywalność *E. coli* [%] w obecności detergentu Awiważ
Percentage survival of *E. coli* in the presence of detergent Awiważ

Czas Time [h]	Stężenie detergentu [mg/dm³] Concentration of detergent [mg/dm³]				
	2000	1000	500	250	125
24	96	99	99	99	99
48	86	99	99	99	98

Tabela 2. Przeżywalność *E. coli* [%] w obecności detergentu Tetrapol
Percentage survival of *E. coli* in the presence of detergent Tetrapol

Czas Time [h]	Stężenie detergentu [mg/dm³] Concentration of detergent [mg/dm³]				
	1000	500	250	125	62,5
24	53	64	75	83	85
48	39	46	63	66	70

Tabela 3. Przeżywalność *E. coli* i *B. subtilis* [%] w obecności barwnika Acid blue 40
 Percentage *E. coli* i *B. subtilis* survival in the presence of dyestuff Acid blue 40

Czas Time [h]	Stężenie barwnika [mg/dm ³] Concentration of dyestuff [mg/dm ³]				
	1000	500	250	125	62,5
<i>Escherichia coli</i>					
24	88	95	95	100	100
48	84	88	90	98	100
<i>Bacillus subtilis</i>					
24	72	84	89	95	98
48	64	82	85	91	97

PODSUMOWANIE

Ze względu na zwiększającą się skalę zanieczyszczenia środowiska naturalnego, ważnym zagadnieniem jest ocena biologicznego zagrożenia związkami obecnymi w ściekach przemysłowych. Ścieki wytwarzane w przemyśle włókienniczym, ze względu na wysoką zawartość substancji powierzchniowo czynnych oraz charakterystyczne intensywne zabarwienie, stwarzają poważne kłopoty w procesie oczyszczania.

Obserwowany obecnie intensywny rozwój badań w zakresie oceny toksyczności umożliwia szybkie wykonanie tego typu oznaczeń. Dzięki zastosowaniu aparatury kontrolno-pomiarowej możliwa jest rejestracja zmian procesów fizjologicznych wytypowanych organizmów. Ze względu na różnice reakcji poszczególnych organizmów łańcucha troficznego określonego ekosystemu, słuszne wydaje się prowadzenie badań metodami klasycznymi. Mechanizm działania barwników na komórki mikroorganizmów nie jest jeszcze dokładnie poznany, gdyż niektóre z nich działają hamująco, inne obojętnie, a jeszcze inne przyspieszają ich wzrost.

W niniejszej pracy przeprowadzono ocenę oddziaływania dwóch wybranych detergentów, o nazwach handlowych Awiważ i Tetrapol oraz błękitu alizarynowego Acid blue 40, na czyste szczepy bakteryjne. We wcześniejszych pracach Katedry [3] oznaczano inhibicję wzrostu kultur mieszanych pochodzących z osadu czynnego, opierając się na normie ISO TC 147 SC5 WG1. Wyniki zbiorcze oznaczeń toksycznego oddziaływania badanych związków przedstawione zostały w tabeli 4.

Zgodnie ze skalą toksyczności według Dockal i Soldana [4], przyjmuje się, że związki, dla których wartość EC_{50} przekracza 1000 mg/dm³, klasyfikowane są jako nietoksyczne. Porównanie wyników analiz uzyskanych dla detergentu Awiważ potwierdziło, że preparat ten, stosowany w zakresie stężeń od 125 do

Tabela 4. Zestawienie wartości stężeń EC_{50} [mg/dm³] dla badanych związków
 Comparison of effective concentration EC_{50} [mg/dm³] of detergents and dyestuff

Nazwa związku Name of compound	Test luminescencji z <i>V. fischeri</i> Test of luminescence with <i>V. fischeri</i>	Test przeżywalności z <i>E. coli</i> Test of survival with <i>E. coli</i>	Test przeżywalności z <i>B. subtilis</i> Test of survival with <i>B. subtilis</i>	Test inhibicji z osadem czynnym [3] Test of inhibition with activated sludge
Awiważ KG conc	> 2000	> 2000	–	1700
Tetrapol CLB	248	327	–	250
Acid Blue 40	907	> 1000	> 1000	23

2000 mg/dm³, nie powoduje inhibicji badanych mikroorganizmów. Jego obecność w ściekach nie zagraża egzystencji organizmów zasiedlających odbiorniki wodne. W przypadku detergentu Tetrapol stwierdzono, że, niezależnie od zastosowanej metody oceny, wartości stężeń efektywnych powodujących 50% redukcję populacji mikroorganizmów testowych były zbliżone i średnia ich wartość wyniosła 275 mg/dm³. Detergent ten został zakwalifikowany jako związek o działaniu słabo toksycznym [4].

Porównanie metod oceny toksyczności błękitu alizarynowego nie dało jednoznacznej odpowiedzi. Wyniki eksperymentów prowadzonych z zastosowaniem szczepów testowych, zarówno Gram-dodatnich *B. subtilis*, jak i Gram-ujemnych *V. fischeri* i *E. coli*, wykazywały nietoksyczność tego barwnika. Wyznaczona wartość EC_{50} w przypadku kontaktu roztworów barwnika z organizmami pochodzącymi z osadu czynnego była 40-krotnie niższa w porównaniu do wartości uzyskanej w próbach prowadzonych z czystymi kulturami, co zgodnie z przyjętą skalą kwalifikowało ten barwnik do związków średnio toksycznych.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można wnioskować, że dla uzyskania wiarygodnej oceny przy określaniu toksyczności związku niezbędne jest równoległe wykonanie badań kilkoma metodami testowymi.

LITERATURA

- [1] Kańska Z., A. Grabińska-Łoniewska, M. Łebkowska, E. Rzechowska: *Ćwiczenia laboratoryjne z biologii sanitarnej*, PWN, Warszawa 1993.
- [2] Kiessling M., M. Rayner-Brandes: *ToxAlert Systems for the Toxicity Testing of Environmental Samples with Luminescent Bacteria*, G.I.T. Laboratory Journal, vol 3, no 4, 254–255 (1998).
- [3] Ledakowicz S., M. Gonera: *Wpływ procesów pogłębionego utleniania na biodegradację ścieków włókienniczych*, V Symp. Biotechnologia Środowiskowa, Ustroń–Jaszowiec 1997, 15–26.
- [4] Łebkowska M.: *Stan i perspektywy rozwoju metod badań toksyczności i biodegradacji*, *Biotechnologia*, **16**, 39–45 (1992).