

RESPIROMETRICKÉ SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍCH VLIVŮ XENOBIOTIK NA AEROBNÍ RESPIRACI MIKROORGANISMŮ AKTIVOVANÉHO KALU

SVATAVA VAŇKOVÁ, IVETA ŘEZNIČKOVÁ
a JAROMÍR HOFFMANN*

Katedra technologie životního prostředí a chemie, VUT Brno, Fakulta technologická ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, e-mail Hoffmann@Zhn.vutbr.cz

Došlo dne 16. V 1999

Klíčová slova. inhibice, respirace, fenol, syntan, mikroorganismy

Úvod

Stále se zvyšující počet průmyslových polutantů kontaminujících životní prostředí si v posledních letech vynutil rozvoj screeningových testů, jejichž úkolem je rychlé posouzení potenciálních toxických účinků těchto látek na živé organismy. Při testování inhibičních účinků polutantů na čistírenský aktivovaný kal, tedy směsnou mikrobiální kulturu, jsou často využívány respirometrické metody. V této práci byly při sledování inhibičních účinků fenolických látek (fenolu a dvou syntetických třísliv tzv. syntanů) na respirační aktivitu aktivovaného kalu aplikovány dvě respirometrické metody. 1) stanovení inhibice respirační aktivity podle ISO 8192 (cit¹) (respirace měřena kyslíkovým článkem) a 2) manometrická metoda stanovení biochemické spotřeby kyslíku, modifikace standardního testu stanovení biologické rozložitelnosti^{2,3}. Kombinace obou postupů umožnila sledování inhibičních vlivů za velmi variabilních, nicméně poměrně přesně definovaných podmínek. Práce navázala na naše dřívější poznatky, týkající se průběhu inhibičních křivek a jejich matematického zpracování⁴ a aplikace zmíněných postupů při sledování inhibičních účinků soli chromu na aktivovaný kal⁵.

Testované syntany jsou používány v každodělném průmyslu k činění kůží. Tyto přípravky nahrazují v procesu činění dřívě používaná přírodní třísliva, která byla k prostředí podstatně šetrnější (lepší rozložitelnost, nižší toxicita). Z chemického hlediska jde o kondenzační produkty substituovaných aromatických sloučenin, hlavně fenolů. Inhibiční účinek syntanů na aktivitu aktivovaného kalu byl již některými autory nestandardními postupy (inhibice BSK₅, respirace, enzymatické aktivity) sledován^{6,8}.

Experimentální část

Modelové vzorky

Fenol, chemicky čistý, Lachema a.s. Brno; syntany vyrobené firmou Tanex a.s. Jaroměř s obchodním názvem Kortan:

Kortan FB - kondenzační produkt sulfonovaného 1-naftolu a fenolu s formaldehydem, neutralizovaný amoniakem, Kortan MX - speciální syntan pro výrobu měkkých usní, kondenzační produkt sulfomethylovaných fenolů s formaldehydem.

Biologický materiál

Aktivovaný kal byl odebrán z městské čistírny odpadních vod ve Zlíně-Malenovicích. V laboratoři byl kal filtrací zbaven hrubých nečistot, promyt pitnou vodou a udržován za aerobních podmínek; nejdéle do 48 h od odběru na čistírně byl použit k testu. Koncentrace suspendovaných látek (Cs) byla stanovena filtrací (2,5-3 μm) a sušením do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C.

Metody

Ke sledování inhibičních účinků zvolených xenobiotik na respirační aktivitu mikroorganismů přítomných v kalu byly použity dva postupy.

Postup 1

Procedura dle¹ ISO 8192 byla použita pro krátkou dobu expozice (zpravidla 1 h). Jako zdroj uhlíku, energie a minerálních látek bylo použito minerální medium (syntetická odpadní voda) podle⁹ OECD. Suspenze aktivovaného kalu o koncentraci přibližně 1000 mg.l⁻¹ suspendovaných látek byla v testovací baňce smíchána se syntetickou odpadní vodou (32 ml.l⁻¹) a s testovanou látkou o různých koncentracích (1-2000 mg.l⁻¹). Celkový objem směsi byl 0,5 l. Kontrolní pokus byl připraven analogicky, pouze bez přídavku testované látky. Jako testovací nádoby byly použity dělicí nálevky o objemu 1 ltr, do kterých byl zespodu stopkou přiváděn vzduch. Tímto způsobem byla suspenze mikroorganismů zásobována kyslíkem a dokonale promíchávána. Hodnota pH byla ve všech testech upravena na 7,3 ± 0,2. Po zvolené době kontaktu byla část směsi přenesena do respirační nádoby a stanovena respirační rychlost (oximetr WTW D1g1 610). Data byla v 10 vteřinových intervalech archivována počítačem po dobu cca 10 minut. Z naměřených hodnot byly pro každou koncentraci testované látky a pro kontrolní pokus vypočteny specifické respirační rychlosti *R* (mg h⁻¹.g⁻¹) a následně inhibice respirační rychlosti / (%) dle vztahu (7):

$$I = (R_k - R_t / R_k) \cdot 100 \quad (1)$$

kde *R_t*, resp. *R_k* jsou rychlosti spotřeby kyslíku v testech s proměnlivými koncentracemi testované látky, resp. v kontrolním pokusu (v mg.l⁻¹.h⁻¹).

Postup 2

Respirace kalu byla měřena v respirometru s manometrickou indikací spotřeby kyslíku (Bial BOD 10, DAK Služovice). Přístroj umožňuje průběžné sledování biochemické spotřeby kyslíku (BSK). Základní částí přístroje je deset měřících jednotek, upevněných do pohyblivého roštu v temperované

* Zaslát veškerou korespondenci

vodní lázni. Každá měřicí jednotka je tvořena dvojicí baněk (měrné a kompenzační) o stejných objemech cca 150 ml. Baňky jsou opatřeny plastovými uzávěry s postranním tubusem a zavzdušňovacím ventilem. Postranní tubusy slouží k propojení párových baněk přes manometrickou U-trubicí. Do těsnicího kroužku plastového uzávěru je zasunuta skleněná zkumavka, opatřená v horní části několika otvory a obsahující roztok KOH pro absorpci vznikajícího CO_2 . Podrobnější popis je uveden v manuálu přístroje.

Pro možnost porovnání výsledků obou metod byly zachovány stejné kultivační podmínky jako u postupu 1 včetně složení minerálního media, pouze celkový objem směsi byl 10× menší (0,05 l). Měření probíhalo při teplotě $25 \pm 0,5$ °C. Z časových závislostí BSK byly pro zvolené časy t (doby expozice) odečteny hodnoty BSK a vypočteny inhibice / (%) analogicky jako shora (rovnice (1)); místo respiračních rychlostí byly ale dosaženy hodnoty BSK v čase t pro vlastní, resp. kontrolní pokusy (BSK_p , resp. BSK_k , v mg l^{-1}).

Analýza naměřených hodnot

Výsledky obou metod byly zpracovány postupem již uvedeným v práci⁴ k sestavení inhibičních křivek a k výpočtu hodnoty efektivní koncentrace (EC_{50}) byla použita rovnice distribuční funkce normálního rozdělení (2):

$$P(x) = \Phi(x - \mu) / \sigma \quad (2)$$

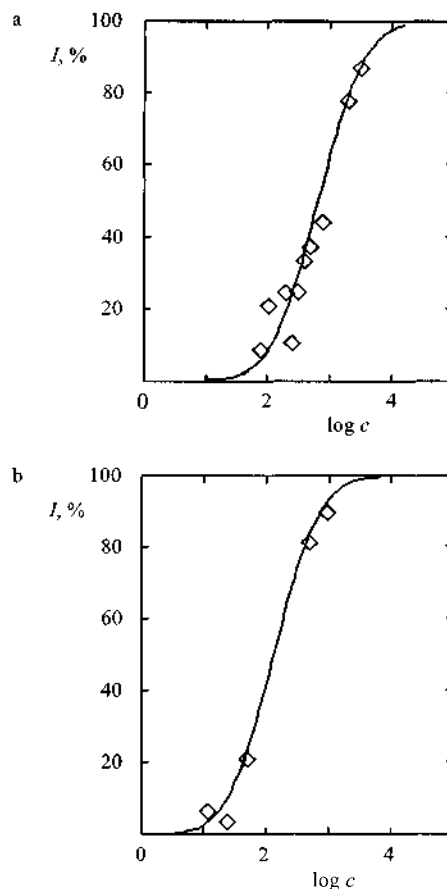
Φ - distribuční funkce standardního normálního rozdělení, x - logaritmus koncentrace testované látky, μ - střed normalního rozdělení, σ - standardní odchylka normalního rozdělení

Pro nalezení regresní křivky byla použita procedura nelineární regrese systému ADSTAT (TnloByte Statistical Software, Ltd.), který používá derivačních postupů pro minimální podmínky nejmenších čtverců pro nelineární regresní model. Takto byly získány hodnoty parametrů μ a σ spolu s 95 % intervaly spolehlivosti (IS). Odhad střední hodnoty μ společně s 95 % intervalem spolehlivosti představuje hledanou hodnotu EC_{50} a její limity.

Výsledky a jejich diskuse

Toxicita xenobiotik na čistírenský kal zjištěna v laboratorních podmínkách je významně ovlivňována experimentálními podmínkami použitých testů. Mezi nejzákladnější vlivy patří vedle druhového zastoupení mikroorganismů v případě směsných mikrobiálních kultur (aktivovaného kalu) doba a intenzita kontaktu mikroorganismů s testovanými látkami (doba expozice), teplota, kyslíkové poměry, přítomnost dalších látek atd. Případně irelevance v tomto směru řeší do jisté míry standardizace testů. V praxi je velmi často potřebná i opačná možnost, tj. změna těchto podmínek a sledování jejich vlivu na inhibiční působení. Typickým příkladem je doba expozice. Aplikace jednoho testu nemusí poskytovat potřebnou variabilitu, výhodná může být jejich kombinace.

Dále jsou popsány možnosti sledování inhibičních účinků fenolu a dvou syntanů na respirační aktivitu aktivovaného kalu pomocí dvou shora popsaných postupů. Pozornost byla zaměřena především na vliv doby expozice na inhibici, reprezentované hodnotami EC_{50} .



Obr. 1. Inhibice respirační rychlosti / fenolem (a) a Kortanem FB (b) (koncentrace c v mg l^{-1}) po hodinové expozici, postup 1

Inhibiční účinek po hodinové expozici

Směs aktivovaného kalu s testovanou látkou a syntetickou odpadní vodou byla v soulase s metodikou¹ ISO 8192 (postup 1) intenzivně míchána a provzdušňována. Po uplynutí jedné hodiny byla změřena respirační rychlost. Hodnoty inhibice / byly vypočteny podle rovnice (1), ke konstrukci inhibičních křivek a k výpočtu 1 h EC_{50} byla použita rovnice (2).

Řadou doplňkových testů (výsledky nejsou prezentovány) bylo zjištěno, že u fenolu a u Kortanu MX nastává za daných experimentálních podmínek prokazatelná inhibice teprve od koncentrace 100 mg l^{-1} , toxicitější Kortan FB inhiboval respiraci již od koncentrace 30 mg l^{-1} .

Příklady inhibičních křivek pro fenol a Kortan FB znázorňuje obr. 1. Z jejich průběhu je zřejmé, že heterogenní kultura aktivovaného kalu reaguje na toxickou látku obdobně jako populace jednoho biologického druhu.

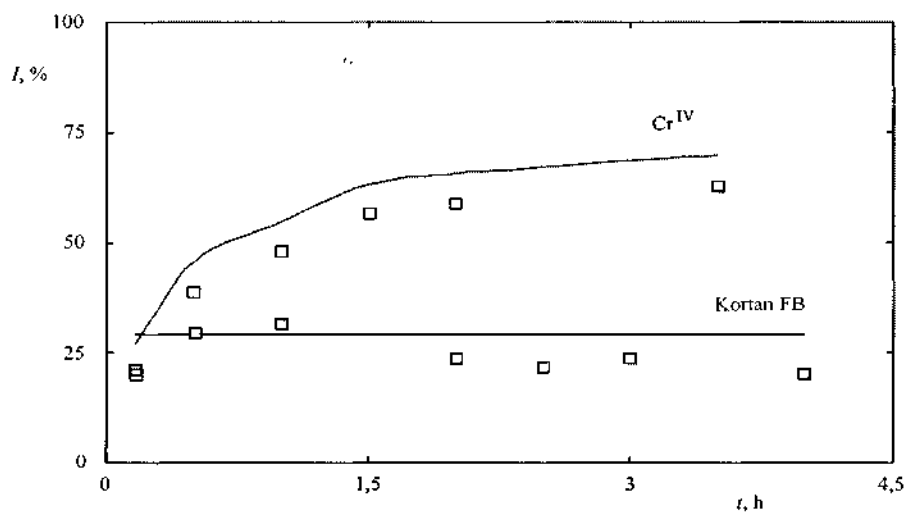
V tabulce I jsou uvedeny hodnoty EC_{50} s příslušnými 95 % IS pro fenol a oba syntany. Po jednohodinové době expozice byl určen inhibiční účinek sledovaných látek v pořadí Kortan FB > Kortan MX > fenol. V tabulce II jsou pro srovnání uvedeny publikované hodnoty EC_{50} pro fenol. Nalezené a publikované hodnoty respirometrických postupů přijatelně korespondují (řádově).

Tabulka I
Hodnoty 1 h EC_{50} pro fenol a syntany

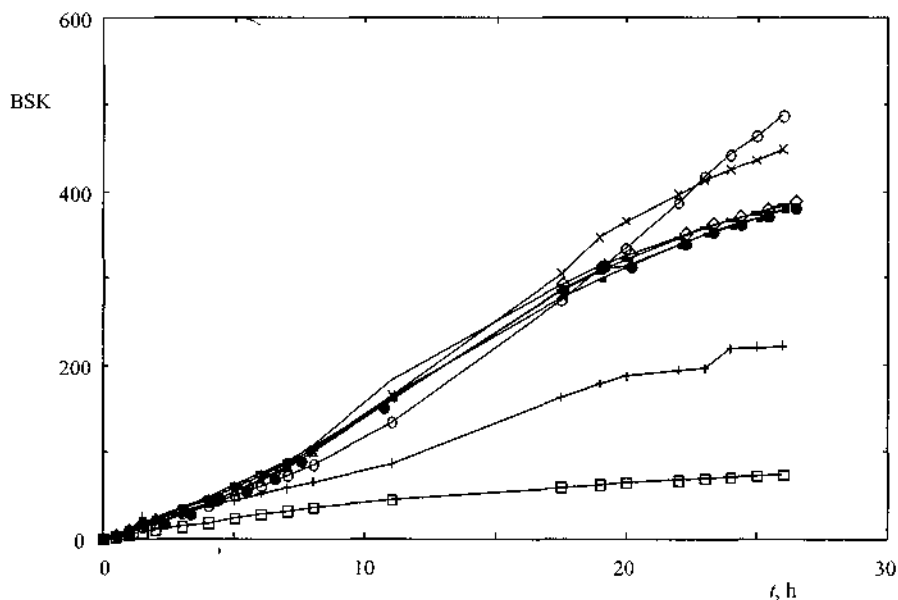
Testovaná látka	1h EC_{50} [$mg.l^{-1}$]	IS (95 %)
Fenol	655	518-830
Kortan MX	438	342-562
Kortan MX	201	77-522
Kortan FB	132	98-191
Kortan FB	153	97-241
Kortan FB	150	110-206

Tabulka II
Publikované hodnoty EC_{50} pro fenol

EC [$mg.l^{-1}$]	Expozice [h]	Test	Citace
>1000	4-6	růstový (městský AK)	10
880	4-6	růstový (průmyslový AK)	10
300	0,5	respirační	10
>100	0,25	dehydrogenasový	11
740	0,5	respirační	12
1000	3	respirační	12
1400	1	dehydrogenasový	12



Obr. 2. Inhibice respirační rychlosti / Kortanem FB a Cr^{VI} v závislosti na době expozice t ; postup 1



Obr. 3. Časový průběh BSK ($mg.g^{-1}$) při různých koncentracích fenolu; — kontrolní p., —◇— 2 $mg.l^{-1}$, —◐— 10 $mg.l^{-1}$, —△— 20 $mg.l^{-1}$, —×— 100 $mg.l^{-1}$, —○— 200 $mg.l^{-1}$, —◑— 800 $mg.l^{-1}$, —□— 2000 $mg.l^{-1}$, postup 2

Inhibiční efekt při krátkodobé (několikahodinové) expozici

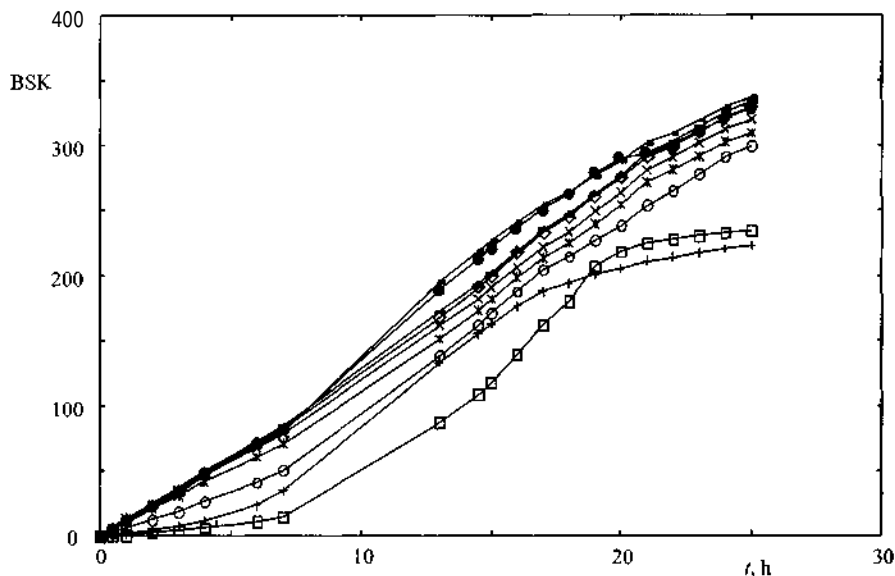
U Kortanu FB byl opět postupem 1 testován měnící se inhibiční účinek v závislosti na době expozice (obr. 2). Koncentrace syntanu byla 100 mg.l^{-1} , což přibližně odpovídá hodnotě EC_{50} pro tuto látku. Stejně jako u ostatních testů byla koncentrace suspendovaných látek přibližně 1000 mg.l^{-1} . Z obrázku je zřejmé, že inhibice naměřená po velmi krátké expozici (10 min) je srovnatelná s inhibičním efektem po tříhodinovém působení.

Pro srovnání je uvedena stejná závislost pro Cr^{VI} , z níž je zřejmé, že inhibice ve sledovaném časovém intervalu postupně narůstá. Tyto rozdíly jsou důsledkem odlišných mecha-

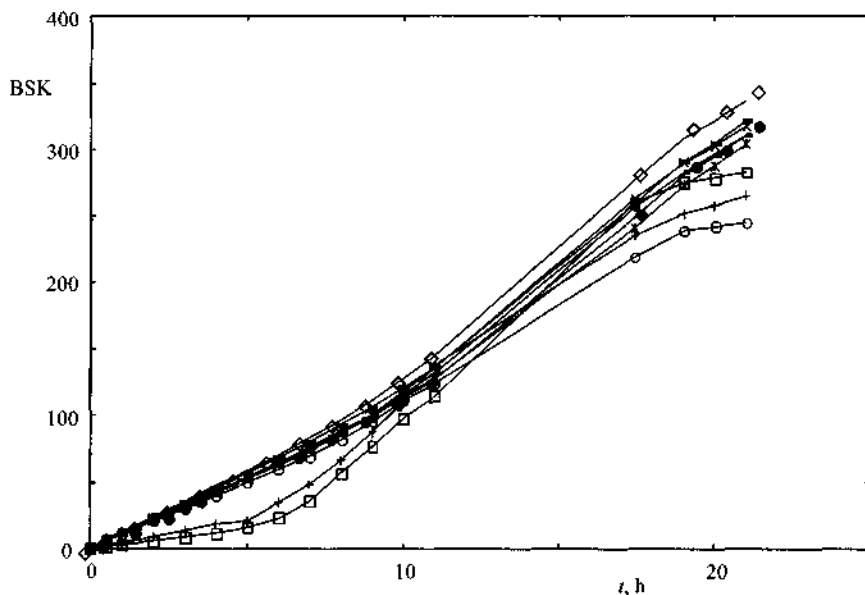
mů působení obou látek. Znalost těchto závislostí je důležitá pro korektní interpretaci hodnoty EC_{50} i pro porovnání mezi-laboratorních výsledků.

Inhibice BSK

Průběžné sledování BSK bylo prováděno na zařízení s manometrickou indikací spotřeby kyslíku na přístroji Bial (postup 2). Dvě měření byla pravidelně prováděna s kontrolní směsí bez toxické látky, ve zbývajících osmi měřících jednotkách byl sledován vliv přidavku testovaných látek v rozmezí koncentrací $1\text{-}2000 \text{ mg.l}^{-1}$. Pro sestavení inhibiční křivky bylo tímto způsobem možno získat maximálně osm hodnot (za



Obr. 4. Časový průběh BSK (mg.g^{-1}) při různých koncentracích Kortanu FB; — kontrolní p, ○— 1 mg.l^{-1} , —■— 2 mg.l^{-1} , —△— 10 mg.l^{-1} , —×— 20 ml.l^{-1} , —*— 80 mg.l^{-1} , —○— 200 mg.l^{-1} , —+— 800 mg.l^{-1} , —□— 2000 mg.l^{-1} , postup 2



Obr. 5. Časový průběh BSK (mg.g^{-1}) při různých koncentracích Kortanu MX; — kontrolní p, ○— 2 mg.l^{-1} , —■— 10 mg.l^{-1} , —△— 20 mg.l^{-1} , —×— 40 ml.l^{-1} , —*— 80 mg.l^{-1} , —○— 200 mg.l^{-1} , —+— 800 mg.l^{-1} , —□— 2000 mg.l^{-1} , postup 2

předpokladu provedení duplicitního měření pouze u kontrolního pokusu). Měření bylo zpravidla prováděno současně na dvou přístrojích.

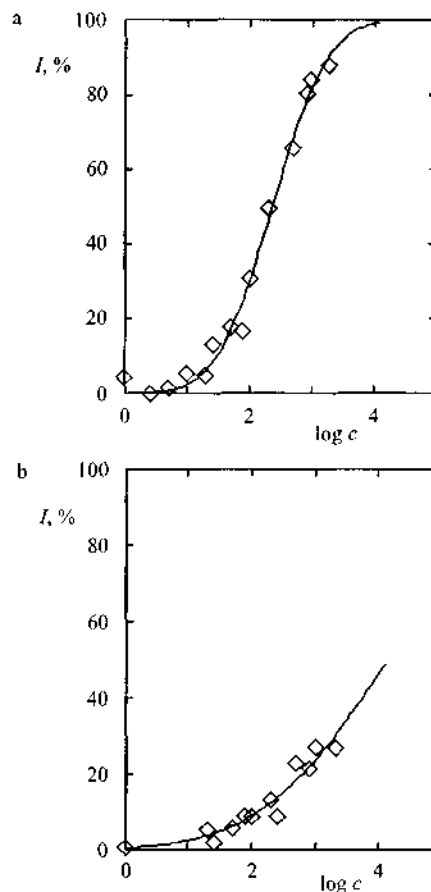
Účelem těchto pokusů bylo především posouzení inhibičních účinků při dlouhodobé expozici (desítky hodin až dny). Nespornou výhodou tohoto postupu je možnost odečtu hodnot při libovolné době expozice v průběhu měření. Pro srovnání s předchozí alternativou byly vypočteny hodnoty EC_{50} i po hodinovém kontaktu s testovanými látkami (tabulka III). Z konfrontace výsledků (tabulka I a III) plyne, že manometrická metoda poskytovala hodnoty $1h EC_{50}$ mírně (pro Kortan FB) až významně (pro fenol) vyšší. Tyto diference byly zřejmě způsobeny méně intenzivním promícháváním testované směsi v manometru; v měřících baňkách docházelo k částečné sedimentaci biologického kalu, čímž byl zpomalen kontakt testované látky s buňkami mikroorganismů. Druhou příčinou těchto diferencí mohly být také dosud neustálené tlakové podmínky v měřících nádobkách manometru v počáteční fázi testů, které se projeví větším rozptylem hodnot inhibičních křivek a tím i vypočtených $1 h EC_{50}$. Lze to dokumentovat větší šířkou 95 % intervalu spolehlivosti v tabulce III. Při dlouhodobější expozici se tyto vlivy již prakticky neprojeví a oba postupy poskytovaly z hlediska intervalu spolehlivosti srovnatelné výsledky.

Oběma postupy bylo zjištěno stejné pořadí inhibičních účinků sledovaných látek po hodinovém kontaktu: Kortan FB > Kortan MX > fenol. Při delší expozici (12-15 hodin) se toto

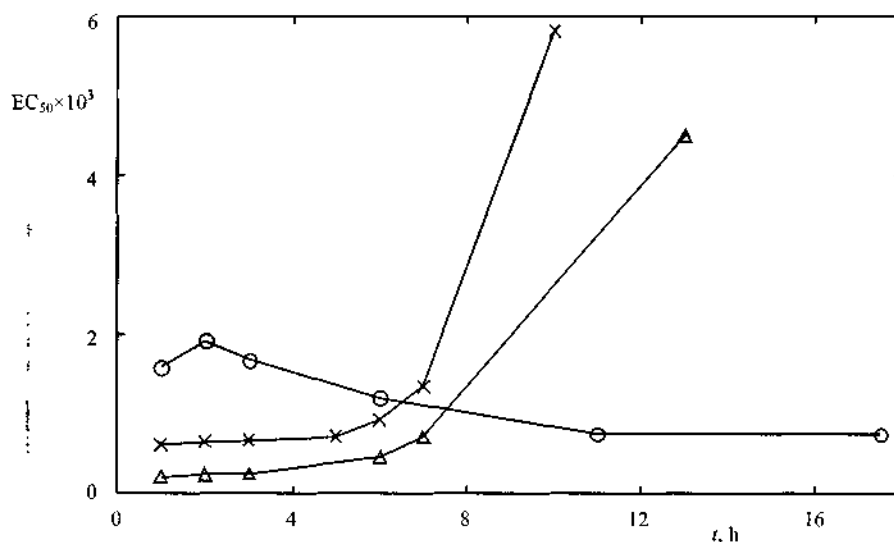
Tabulka III
Hodnoty $1h EC_{50}$ stanovené manometrickou metodou

Testovaná látka	$1h EC_{50}$ [$mg.l^{-1}$]	IS (95 %)
Fenol	1551	729 - 3305
Kortan MX	594	452-785
Kortan FB	196	152-253

pořadí prakticky obrátilo a oba syntany v koncentracích několika $g.l^{-1}$ již respiraci významněji neovlivňovaly (viz níže).



Obr. 6. Inhibice respirační rychlosti I Kortanem FB (koncentrace c v $mg.l^{-1}$) po třech (a) a osmnácti hodinách (b) expozice; postup 2



Obr. 7. Vliv doby expozice na inhibiční účinky (efektivní koncentrace EC_{50}) fenolu, Kortanů FB a MX, —x—MX, —△—FB, —○—fenol, postup 2

inhibice při dlouhodobé expozici

Vliv fenolu a obou syntanů na časový průběh BSK při různých koncentracích těchto látek znázorňují obr. 3-5. Při testech s fenolem (obr. 3) byla zjištěna významná inhibice teprve u koncentrací vyšších než 200 mg l⁻¹. U nižších koncentrací byla zaznamenána mírná inhibice pouze na počátku pokusu, po několika hodinách byla rychlost BSK srovnatelná s kontrolním pokusem, popř. i vyšší. U nejvyšší testované koncentrace 2000 mg l⁻¹ byla zjištěna výrazná represe BSK po celou dobu měření (27 h). Naproti tomu u obou testovaných syntanů (obr. 4, 5) došlo po několika hodinách expozice i u nejvyšších koncentrací 800-2000 mg l⁻¹ ke značnému poklesu inhibičních účinků. Tento náhlý pokles inhibičních účinků s dobou inkubace znázorňují i příklady inhibičních křivek, vypočtených podle rovnice (2) pro Kortan FB (obr. 6). Zatímco po třech hodinách expozice byla vypočtena střední hodnota EC₅₀ 233 mg l⁻¹, po 18 hodinách byla hodnota EC₅₀ > 2000 mg l⁻¹.

Popsané změny inhibičních účinků na respirační aktivitu aktivovaného kalu v závislosti na době kontaktu znázorňuje obr. 7. Zatímco inhibiční účinky obou syntanů přibližně po 12 hodinách inkubace velmi výrazně poklesly, u fenolu se naopak inhibiční účinek s dobou působení mírně zvyšoval.

Manometrická metoda představuje mezistupeň mezi kratkodobým respiračním testem a kontinuálně pracujícím modelem biologické aktivace. Umožňuje do jisté míry simulovat podmínky adaptace a množení mikroorganismů v podmínkách dlouhodobého kontaktu. Ke stejným závěrům dospěli také Broecker a Zahn¹³, kteří srovnávali inhibiční účinek 3,5-dichlorfenolu, naměřeny pěti různými kratkodobými testy s výsledky získanými v laboratorním modelu aktivace inhibice BSK (stanovována na přístroji Sapromat) po 20 hodinách se nejlepe shodovala s inhibicí biodegradace procesu na modelové čistírně. Při krátké době kontaktu (2 hodiny) byl pozorován výraznější inhibiční účinek.

Závěr

Posuzování inhibičních účinků xenobiotik na respirační aktivitu mikroorganismů aktivovaného kalu na základě výsledků dvou respirometrických metod, tj. měření respirační rychlosti kyslíkovou elektrodou podle ISO 8192 (cit¹) a raanometrického stanovení biochemické spotřeby kyslíku, se ukázalo jako velmi výhodné. První postup lze doporučit pro testy inhibice při kratkodobé expozici za standardních podmínek, druhý umožňuje sledování změn inhibičních účinků v průběhu dlouhodobého kontaktu mikroorganismů (a tedy jejich případné adaptace) s testovanými látkami, poskytuje při srovnatelné práci mnohem více informací. Získané výsledky jsou zřejmě bližší působení testovaných látek v reálných podmínkách biologické aktivace. Uvedené vyplývá z těchto testů s fenolem a dvěma syntany i z výsledků inhibice respiračního procesu solemi chromu⁵.

Práce byla realizována v rámci grantu Grantové agentury ČR grant č. 104/93/1066

LITERATURA

- 1 ISO Standard 8192-84 Water quality Test for inhibition of oxygen consumption of activated sludge
- 2 ČSN EN 29408, 1995 (ISO Standard 9408 1991)
- 3 OECD Guideline for Testing of Chemicals (Paris) 1992, 301
- 4 Vaňkova S., Hoffmann J., Řezníčková I. Acta Hydrochim Hydrobiol 25, 141 (1997)
- 5 Vaňkova S., Kupec J., Hoffmann J. J. Ecotoxicol Environ Safety 42, 16(1999)
- 6 Corning D. R. The Biodegradability of Tannery Chemicals XV Konferenz Internationalen Union der Leder-Chemiker und Chemiker Verbände (IX/3), Hamburg, 3 - 7 Sept 1997
- 7 Kupec J., Tkač J., Mladek M. Kožařství 29, 12 (1979)
- 8 Vinklerek Z. Kožařství 34, 346 (1984)
- 9 OECD Guidelines for Testing of Chemicals (Paris) 1984, 1
- 10 Strotmann U. J., Eglasaer H., Pagga U. Chemosphere 28, 755(1994)
- 11 Strotmann U. J., Zarembo S., Bias W. R. Acta Hydrochim Hydrobiol 20, 136(1992)
- 12 Dutka B. J., Nyholm M., Petersen J. Water Res 17, 1363 (1983)
- 13 Broecker B., Zahn R. Water Res 11, 165 (1977)

S. Vaňková, I. Řezníčková, and J. Hoffmann (Department of Environmental Technology, Faculty of Technology, Technical University Brno) **Respirometric Observation of Inhibitory Effects of Xenobiotics on Aerobic Respiration of Activated Sludge**

With phenol and two syntans (synthetic tanning agents) as examples, a description is given of possible ways to observe inhibitory effects of water-soluble xenobiotics on the respiratory activity of microorganisms of activated sludge using two procedures: the respirometric method after ISO 8192 or manometric method of determination of biochemical oxygen demand. Description of inhibition curves and calculations of effective concentrations, EC₅₀, using the equation of a normal distribution function was satisfactory in both methods. Attention was mainly focused on evaluation of the influence of exposure time on inhibition expressed by EC₅₀ values. After 1 h exposure, the inhibitory effects decreased in the order Kortan FB > Kortan MX > phenol. At 15 h exposure, the order was virtually reversed, inhibitory effects of syntans on respiration were negligible, and the phenol toxicity grew with the contact time. The ISO method proved suitable for determination of inhibition after a short contact time (1 h) under "standard" conditions, the manometric test, on the contrary, for assessment of changes in inhibitory effects during a long-term contact of microorganisms with tested substances and thus for studying possible adaptations and behaviour in real conditions of biological activation.