

## OCENJEVANJE STRUPENOSTI ODPADNE VODE S TESTNIMI ORGANIZMI - VODNIMI BOLHAMI *DAPHNIA MAGNA*

Tanja ČELHAR

dipl. biologinja, Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, SI-6230 Postojna, Titov trg 2  
B.Sc. in biology, Karst Research Institute, Scientific Research Centre of the Slovene Academy of Sciences and Arts,  
SI-6230 Postojna, Titov trg 2

### IZVLEČEK

Napravljen je bil test strupenosti za oceno zaviralnih vplivov odpadnih vod, ki tečejo v odvodnik oz. kanalizacijo na območju Postojne. Uporabljene so bile različne koncentracije odpadne vode. Ugotovljen je bil odstotek prizadetosti osebkov *Daphnia magna* Straus. Test je mogoče uporabljati kot izločilni test in kot osnovo za kemično in biološko analiziranje.

**Ključne besede:** test strupenosti, vodne bolhe (*D. magna*), odpadne vode, biološke čistilne naprave  
**Key words:** toxicity test, water fleas (*D. magna*), effluent, discharges, biological waste water treatment plants

### TESTI STRUPENOSTI

Zaradi vse večje industrializacije in gostejše naseljenosti so površinske in talne vode vse bolj onesnažene. Posebno nevarnost pomenijo strupene snovi. Zaradi prepustnosti tal, še posebno na kraškem svetu, strupene odpadne vode ogrožajo podtalnico, ki je glavni vir pitne vode. Padavine lahko spirajo topne komponente skozi prepustne karbonatne kamnine globlje v kras, vanj pa ponikajo tudi reke ponikalnice, ki na svojem površinskem toku sprejmejo odpadne vode naselij, ki v večini primerov še nimajo čistilnih naprav, kot tudi odpadne industrijske vode. Vodni organizmi z razgrajevanjem organskih odpadnih snovi vplivajo na kvaliteto voda. Če je odpadna voda strupena, poškoduje ali uniči življenjsko združbo vodotokov. Strupene snovi, ki pritekajo z odpadnimi vodami v biološke čistilne naprave, zavirajo oziroma uničijo delovanje mikroorganizmov in s tem zmanjšajo učinek čiščenja, to pa posredno obremenjuje vodotok. Nekateri mikroorganizmi v bioloških čistilnih napravah se lahko prilagodijo precej visokim koncentracijam strupenih snovi, ki pa v vodotokih poškodujejo občutljivejše organizme.

Obstoj življenjske združbe je pogoj za samoočišče-

nje vode, zato se z zastrupitvijo vodne flore in favne bistveno zmanjša ali celo prekine samočistilna moč vodotoka. Zastrupitve oz. prekinitev samočistilnih procesov so izredno nevarne, saj sta istočasno prizadeti biološka razgradnja organskih snovi in asimilacija zelenih rastlin, pri kateri nastaja tudi kisik, ki je potreben za zaključek samoočiščevalnih procesov.

Pojem strupenosti se nanaša tako na koncentracijo strupenih snovi kot na čas, v katerem strupene snovi delujejo na organizme. Za ovrednotenje škodljivosti odpadnih vod opravljamo v laboratoriju specifične kemijske analize in fiziološke poskuse s testnimi organizmi. Noben organizem, ki ga uporabimo v testu, ni idealen, zato strupenost ugotavljamo na različnih organizmih. Vedno poskušamo poiskati najobčutljivejšo vrsto.

Kemijski dejavniki, ki vplivajo na strupenost, so pH in trdota vode, temperatura in raztopljeni kisik ter biološki dejavniki. Sprememba pH deluje na vodne organizme posredno in neposredno, pri čemer je posreden vpliv spremembe pH bolj pomemben, ker povzroči znatne spremembe v kemizmu vode. Pri tem se spremeni tudi strupenost mnogih snovi. Vsak organizem ima tolerančno območje temperature, ki je odvisno od

njegove razvojne stopnje, genetskih in ekoloških vplivov. Temperatura zunaj tega območja povzroči smrt organizma. Vzrok smrti pri neprimerni temperaturi je izguba ozmoregulacije, spremembe v celičnih encimih, lipidnih membranah in obarjanje proteinov. Višje temperature vplivajo na koncentracijo raztopljenega kisika na dva načina: znižajo topnost kisika v vodi in koncentracijo raztopljenega kisika zaradi povečane biokemijske razgradnje organskih snovi. Zato vodni organizmi bolj intenzivno sprejemajo vodo skozi škrge in celične membrane, skupaj z njo pa tudi strupene snovi. Toksičnost kovine ob prisotnosti organskih snovi se malo zmanjša zaradi tvorbe organokovinskih kompleksov. Kovine se adsorbirajo tudi na kolooidne in suspendirane snovi. Ker se koncentracija organskih snovi v vodi stalno spreminja, ne poznamo koncentracije, niti vsebnosti organskih snovi. Na strupenost vplivajo tudi biološki dejavniki, ki so določeni z občutljivostjo vrst in osebkov znotraj ene vrste. Občutljivost različnih vrst je povzročena z načinom življenja, prehranjevanja, razmnoževanja, metabolizma in drugo. Razlike v občutljivosti med osebki iste vrste določajo fiziološko stanje, dedni faktor, dnevna in sezonska nihanja, starost organizmov, razvojna stopnja in velikost. Pomembna je tudi prilagoditev na določene razmere v okolju.

Razdelitev testov strupenosti po različnih avtorjih ni enotna. V ameriških standardnih metodah so razdeljeni glede na trajanje poskusa, dodajanje odpadne vode in namen. Glede na trajanje poskusa poznamo kratke (akutne), srednje dolge in dolge (kronične) teste. Akutni testi trajajo od nekaj ur pri nižjih organizmih, do nekaj dni pri ribah. Z njimi ugotavljamo smrtne koncentracije, kjer pogine 50% organizmov (LC<sub>50</sub>), oz. efektivne koncentracije, kjer je prizadetih 50% organizmov (EC<sub>50</sub>) in sicer v primerih, kjer je smrt organizmov težko določiti (npr. *Daphnia*). Rezultati akutnih testov nam dajo hitro oceno o strupenosti, lahko primerjamo relativne ocene različnih strupov na isti testni organizem, ugotavljamo relativno občutljivost različnih testnih organizmov na isto strupeno snov ali določamo vpliv pH, temperature itd. na strupenost. S testi strupenosti, ki jih uviščamo med fiziološke metode, pri dogovorjenih in standardiziranih pogojih v laboratoriju ugotavljamo vpliv odpadne vode na testne organizme pri različnih koncentracijah in dobimo kvantitativne odzive o strupenosti (odstotek poškodovanih, mrtvih živali oz. odstotek zmanjšanja njihovega delovanja). Ugotoviti moramo tisto koncentracijo odpadne vode, ki nima več vpliva na najobčutljivejši testni organizem. S testi strupenosti lahko ugotavljamo tudi vpliv pripravljene strupene snovi na testne organizme. Izbira testnih organizmov je precej težka. Pri izbiri testnih organizmov so med pomembnejšimi pogoji splošna razširjenost, enostavna laboratorijska gojitev, primernost za laboratorijsko testiranje, občutljivost organizmov. Pomembno vlogo imata tudi ekonomski dejavnik in izbira testnega postopka.

Strupenost odpadne vode najprej ugotavljamo z izločilnim testom z vodnimi bolhami *Daphnia magna*, da ugotovimo, ali je odpadna voda sploh strupena. Kriterij odgovora, ki se izvaja v primerjavi s kontrolo, je normalno gibanje vodnih bolh. V primeru, da je odpadna voda strupena, napravimo še teste z organizmi, ki jih izberemo tako, da imamo predstavnike iz skupine razgrajevalcev, proizvajalcev in potrošnikov. Predstavniki razgrajevalcev so bakterije, ki mineralizirajo organsko snov, proizvajalci so alge in makrofiti, ki iz anorganske snovi delajo organsko snov, potrošniki pa so npr. raki in ribe. Za izvedbo testov je pomembna razredčevalna voda, ki jo uporabljamo za razredčevanje čistih raztopin strupenih snovi oz. odpadnih vod in za kontrolo (kontrolno pomeni razredčevalna voda, brez dodatnih strupenih snovi oz. odpadne vode). Za razredčevanje lahko uporabljamo vodo iz neonesnaženega vodotoka, neklorirano vodovodno vodo ali pripravljeno razredčevalno vodo (destilirana voda z dodatki soli). Z opravljenim testom ne moremo identificirati materiala, ki se bioakumulira, biopovečuje ali pa je prisoten v okolju. Direktna ekstrapolacija na druge živali ni možna, lahko pa nam rabi kot izločilni test. Pozitivna stran testov strupenosti je, da so ponovljivi, negativna pa, da pomenijo drugačne odgovore organizmov, kot so v naravi. Populacije organizmov v laboratoriju so gojene v bolj ali manj konstantnih razmerah, so vzgojene in niso naravne.

Med biološkimi metodami je prva metoda, ki so jo prevzeli v ISO standardih za določanje kvalitete vode, test z vodnimi bolhami (*Daphnia pulex* ali *Daphnia magna*). Pri tem testu, ki je akuten, kemičnih učinkov ne opazujemo. *Daphnia* je primerna za kratkotrajajoče, akutne, statične teste, pri katerih ugotavljamo negibnost živali. S temi testi določamo EC<sub>50</sub> po 24 ali 48 urah. Po podatkih iz literature sta tako *Daphnia magna* kot *Daphnia pulex* razen v nekaterih izjemah približno enako občutljivi na strupene snovi. Osebki vrste *Daphnia magna* se več uporabljajo iz preprostega razloga, da so njene telesne dimenzije večje, čeprav to ni avtohtona vrsta v Sloveniji. *Daphnia magna* pa ima še druge določene prednosti pred drugimi organizmi (npr. ribami): gojenje v manjših akvarijih zahteva manjšo ceno in prostor, zaradi hitrega razmnoževanja imamo vedno na voljo dovolj testnih živali, krajša življenjska doba vodnih bolh (60 dni) pripomore k temu, da test traja znaten del življenjskega cikla, živali, ki jih uporabljamo v poskusu, so genetsko enotne. Po podatkih iz literature sta vodna bolha *Daphnia* in šarenka *Salmo gairdneri*, ki se navadno uporabljata v ribjih testih, približno enako občutljivi na strupe (tab. 1).

Rod *Daphnia* spada med rake veslonožce, osebki so veliki 1-5 mm. Partenogenetske samice živijo pri 20°C do štiri mesece. V laboratoriju jih gojimo v vodi iz narave ali v neklorirani vodovodni vodi. Hranimo jih z bakterijami, algami, kvasom, skupaj z ekstrakti soli in

organskih snovi. *Daphnia* je najboljčutiljivejša v času do prve levitve. Ker imamo zaradi hitrega razmnoževanja na voljo različno stare živali, uporabljamo za testiranje vedno mlade živali.

| STRUP           | DAPHNIA EC <sub>50</sub><br>(24 ur v mg/l) | ŠARENKA EC <sub>50</sub><br>(24 ur v mg/l) |
|-----------------|--|--|
| NH <sub>3</sub> | 0.8  | 0.5  |
| Cl (prost)      | 0.15                                       | 0.02                                       |
| CIANID          | 1.9  | 0.08                                       |
| FENOL           | 12.5                                       | 11.0                                       |
| Cu              | 0.02                                       | 0.10                                       |
| Ni              | 13.0                                       | 30.0                                       |
| Pb              | 2.5  | 1.5  |
| Zn              | 14.0                                       | 2.0  |
| Cr              | 1.4  | 70.0                                       |
| Ag              | 0.013                                      | 0.75                                       |
| Cd              | 0.35                                       | 3.8  |
| 2.4D            | 100.0                                      | 250.0                                      |
| DALAPON         | 16.0                                       | 252.0                                      |

**Tabela 1: Primerjava občutljivosti med šarenko in vodno bolho.**

**Table 1: Collation of sensitiveness between rainbow trout and water flea.**

#### MATERIAL IN METODE

Zanimala nas je primerjava kvalitete vode in zavrnljivi vplivi odpadne vode na območju Postojne. Preučevana voda iz čistilne naprave Postojna odteka v postojnsko jamski kraški sistem, iz čistilne naprave klavnice Kal pa se zbira voda v kraškem vodonosniku, od koder po podzemlju doseže tržaški Kras. Uporabili smo testne organizme *Daphnia magna* Straus in napravili teste strupenosti.

Kot razredčevalno vodo smo uporabili prezračeno vodovodno vodo, z dodanim 1 ml fosfatnega pufra, 1 ml MgSO<sub>4</sub>, 1 ml CaCl<sub>2</sub>, 1 ml FeCl<sub>3</sub> na en liter prezračene vode (vodo prezračujemo 24 ur, da ven izženemo oz. oksidiramo rezidualni klor). Za izvedbo testov strupenosti moramo poznati nekatere osnovne podatke o odpadni vodi: pH, KPKd, BPK<sub>5</sub> smo določali po metodah iz Standard Methods, izmerili smo vsebnost organskih snovi in neraztopljenih snovi. Za testiranje smo uporabili neobdelano odpadno vodo, odvzeto na dotoku čistilne naprave Postojna in čistilne naprave Klavnica Kal in enako na iztoku obeh čistilnih naprav. Vodne bolhe so bile gojene v manjših čašah v termostatisiranem prostoru s temperaturo 20 ± 2°C. Trikrat tedensko so bile hranjene z raztopino kvasa. Za teste smo uporabili 24-

48 ur stare bolhe. Poskusi so bili izvedeni v petrijevkah. Nalili smo 30 ml vzorca z ustrežno koncentracijo odpadne vode ali 30 ml razredčevalne vode (kontrola), dodali 10 mladih vodnih bolh in petrijevke postavili v termostat (20°C). Vse poskuse smo delali v dveh paralelkah. Po 24-ih urah smo presteli negibne živali. Za negibne živali imamo tiste, ki po 15 sekundah ne reagirajo na nežni dotik s palčko ali pipeto. Izračunali smo odstotek negibnih živali glede na kontrolo. Na splošno velja, da rezultate poskusa upoštevamo, če je v kontroli manj kot 10% negibnih osebkov.

#### REZULTATI

Razlaga: - 30 ml odpadne vode pomeni, da je bilo v petrijevki 30 ml vode iz dotoka oz. iztoka in nič prezračene - 20 ml odpadne vode pomeni, da smo imeli v petrijevki 20 ml vode iz dotoka oz. iztoka in 10 ml prezračene vode - 0 ml odpadne vode pomeni, da smo imeli v petrijevki 30 ml prezračene vode, kar je pomenilo kontrolo.

|                     | dotok ČN<br>Postojna | iztok ČN<br>Postojna |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| KPKd                | 407 mg/l             | 75 mg/l              |
| BPK <sub>5</sub>    | 197 mg/l             | 16 mg/l              |
| organske snovi      | 270 mg/l             | 83 mg/l              |
| neraztopljene snovi | 88 mg/l              | 17 mg/l              |
| pH                  | 7.57                 | 7.92                 |

**Tabela 2: Osnovni fizikalni in kemični podatki o odpadni vodi na dotoku in iztoku ČN Postojna, dne 10.02.1993.**

**Table 2: Basic physical and chemical data on effluent discharges at the inlet and outlet of the Postojna waste water treatment plant (WWTP), February 10th 1993.**

|                     | dotok ČN<br>Klavnica Kal | iztok ČN<br>Klavnica Kal |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| KPKd                | 8467 mg/l                | 172 mg/l                 |
| BPK <sub>5</sub>    | 5600 mg/l                | 59 mg/l                  |
| neraztopljene snovi | 3860 mg/l                | 20 mg/l                  |
| pH                  | 6.85                     | 7.30                     |

**Tabela 3: Osnovni fizikalni in kemični podatki o odpadni vodi na dotoku in iztoku ČN Klavnica Kal, dne 17.02.1993.**

**Table 3: Basic physical and chemical data on effluent discharges at the inlet and outlet of the Kal Slaughterhouse WWTP, February 17th 1993.**

| DOTOK NA ČN POSTOJNA    |    |                            |   | IZTOK IZ ČN POSTOJNA    |    |                            |   |
|-------------------------|----|----------------------------|---|-------------------------|----|----------------------------|---|
| konc. odpadne vode v ml |    | % negibnih osebkov (24 ur) |   | konc. odpadne vode v ml |    | % negibnih osebkov (24 ur) |   |
| ponovitve v paralelkah  |    |                            |   |                         |    |                            |   |
| 30                      | 30 | 0                          | 0 | 30                      | 30 | 0                          | 0 |
| 20                      | 20 | 0                          | 0 | 20                      | 20 | 0                          | 0 |
| 10                      | 10 | 0                          | 0 | 10                      | 10 | 0                          | 0 |
| 0                       | 0  | 0                          | 0 | 0                       | 0  | 0                          | 0 |

**Tabela 4: Odstotek negibnih osebkov po 24 urah, glede na koncentracijo odpadne vode iz ČN Postojna.**

**Table 4: Percentage of motionless individuals after 24 hours, subject to the concentration of effluent discharges from the Postojna WWTP.**

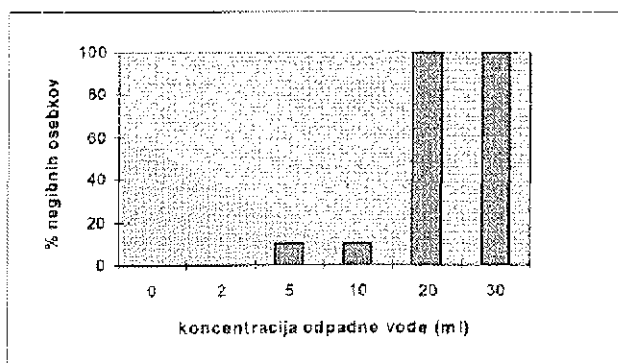
| DOTOK NA ČN KLAVNICA KAL |    |                            |     | IZTOK IZ ČN KLAVNICA KAL |    |                            |  |
|--------------------------|----|----------------------------|-----|--------------------------|----|----------------------------|--|
| konc. odpadne vode v ml  |    | % negibnih osebkov (24 ur) |     | konc. odpadne vode v ml  |    | % negibnih osebkov (24 ur) |  |
| ponovitve v paralelkah   |    |                            |     |                          |    |                            |  |
| 30                       | 30 | 100                        | 100 | 30                       | 20 |                            |  |
| 20                       | 20 | 100                        | 100 | 20                       | 10 |                            |  |
| 10                       | 10 | 10                         | 10  | 10                       | 0  |                            |  |
| 5                        |    | 10                         |     | 0                        | 0  |                            |  |
| 2                        |    | 0                          |     |                          |    |                            |  |
| 0                        |    | 0                          |     |                          |    |                            |  |

**Tabela 5: Odstotek negibnih osebkov po 24 urah, glede na koncentracijo odpadne vode iz ČN Klavnica Kal.**

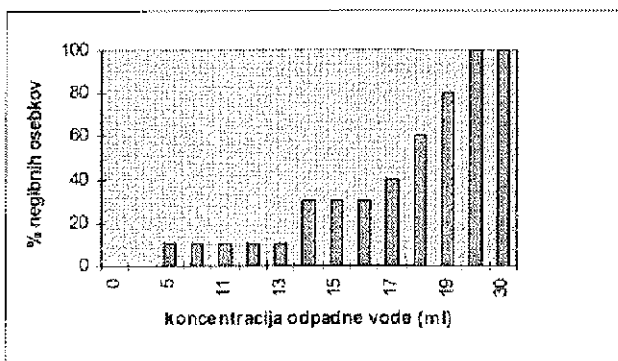
**Table 5: Percentage of motionless individuals after 24 hours, subject to the concentration of effluent discharges from the Kal Slaughterhouse WWTP.**

Ker je razlika v odstotku negibnih osebkov med 10 in 20 ml odpadne vode velika, sklepamo, da je do preskoka prišlo nekje med obema koncentracijama. Za ugotovitev tiste koncentracije odpadne vode, ki nima več vpliva na naš testni organizem, smo zato naredili dodatne analize s postopnim dodajanjem mililitra odpadne vode:

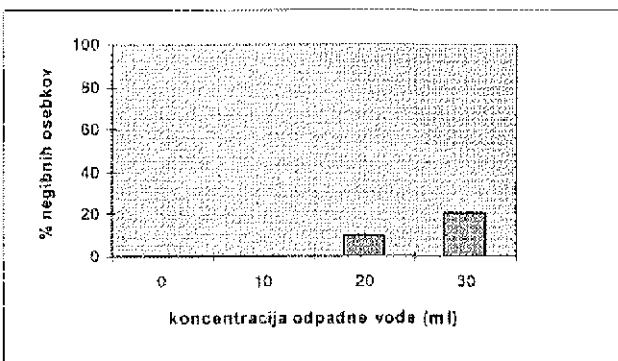
- D<sub>11</sub> (11 ml odpadne vode iz dotoka ČN Klavnica Kal + 19 ml prezračene vode) 10% negibnih osebkov (1 = negiben)
- D<sub>12</sub> 10% negibnih osebkov
- D<sub>13</sub> 10% negibnih osebkov
- D<sub>14</sub> 30% negibnih osebkov
- D<sub>15</sub> 30% negibnih osebkov
- D<sub>16</sub> 30% negibnih osebkov
- D<sub>17</sub> 40% negibnih osebkov
- D<sub>18</sub> 60% negibnih osebkov
- D<sub>19</sub> 80% negibnih osebkov



Graf 1a



Graf 1b



Graf 1c

**Graf 1a, b, c: Odstotek negibnih osebkov po 24 urah, v odvisnosti od koncentracije odpadne vode.**

a: dotok na ČN Klavnica Kal

b: dotok na ČN Klavnica Kal

c: iztok iz ČN Klavnica Kal

**Graph 1a, b, c: Percentage of motionless individuals after 24 hours, subject to the concentration of effluent discharges:**

a) inlet at the Kal Slaughterhouse WWTP

b) inlet at the Kal Slaughterhouse WWTP

c) outlet at the Kal Slaughterhouse WWTP

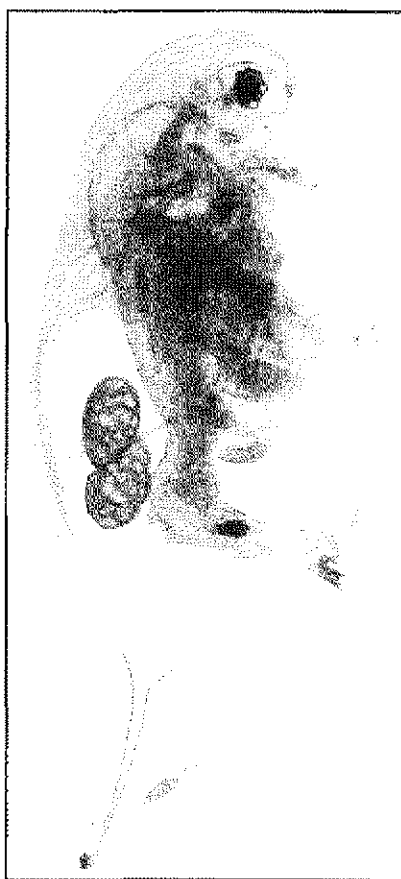
## RAZPRAVA IN SKLEPI

Za ocenitev strupenosti odpadne vode iz čistilne naprave Postojna in čistilne naprave Klavnice Kal smo uporabili akutni test z vodnimi bolhami. Čeprav voda iz čistilne naprave Postojna na organizme ni delovala toksično (niti v primeru, ko so bili pod vplivom 100% koncentracije neobdelane odpadne vode), pa to ne pomeni, da nima toksičnega vpliva na okolje. To nam pokažejo drugi osnovni kemijski podatki, kot so pH, KPKd, BPK<sub>5</sub>, koncentracija organskih in neraztopljenih snovi. Te vrednosti so bile na določenih mestih precej visoke in so se zmanjšale po delovanju čistilne naprave na bolj ali manj normalne vrednosti (določene po standardnih merilih).

Odpadna voda iz čistilne naprave Klavnica Kal je na organizme delovala toksično. Vzrok temu nam ni znan,

tako da nam test omogoča in dovoljuje le izločitev vode iz uporabe. Izmerjeni fizikalni in kemijski parametri v odpadni vodi ČN Klavnica Kal so bili visoko nad dovoljenimi vrednostmi. Potrebna bi bila še druga testiranja, zlasti z bakterijami, algami *Scenedesmus quadricauda* in ribami *Salmo gairdneri*, da bi ugotovili vrsto in koncentracijo strupa, ki je prizadel testne organizme.

Zavedati se moramo, da je potreben nenehen razvoj testnih metod, izbira primernejših testnih organizmov in prilagajanje tujih izsledkov našim razmeram. Tako bomo poleg že uveljavljenih akutnih testov strupenosti izvajali kronične teste, s katerimi bi ugotovili maksimalne dovoljene koncentracije (MDK) strupenih snovi oziroma vpliv odpadnih vod, ki dalj časa pritekajo v vodotok.



*Daphnia magna* (samica z jajci) je najpogostejša vrsta iz rodu *Daphnia* v Sloveniji (Foto: A. Brancelj).

*Daphnia magna* (female with eggs) is one of the most common species of the genus *Daphnia* in Slovenia (Photo: A. Brancelj).

## SUMMARY

A toxicity test was carried out to assess the restraining influence of the effluent discharges flowing into the Postojna drainage and sewage system. Different concentrations of waste water were used to establish the percentage of the affected individuals of *Daphnia magna* Straus. The test may be used as an eliminating test and as a basis for chemical and biological analyses.

## LITERATURA

- Čelhar, T. 1995. Nastajanje obrambnih trnov pri vodnih bolhah *Daphnia hyalina* v stiku z ličinkami *Chaoborus flavicans*. Diplomski naloga. Ljubljana, BF, Oddelek za biologijo.
- Hren, M. 1988. Prispevek k metodologiji vrednotenja škodljivosti odpadnih vod. Diplomski naloga. Ljubljana, Kemija in kemijska tehnologija.
- Kogovšek, J. 1994. Impact of human activity on Škocjanske jame (Človekov vpliv na Škocjanske jame). Acta carsologica, Ljubljana, 23, 73-80.
- Kogovšek, J. 1995. Some Examples of the Karst Water Pollution on the Slovene Karst (Primeri onesnaževanja kraških voda na slovenskem krasu). Acta carsologica, Ljubljana, 24, 304-312.
- Moris, G. M., Tech, B., Biol, B., Buckley, F. T. 1984. The Role of the *Daphnia* Bioassay in the Assessment of the Quality of Effluent Discharges. Water Pollution Control, 83, 539-546.
- Perrin, N., Bradley, M. C. & Calow, P. 1990. Plasticity of storage allocation in *Daphnia magna*. Oikos, 59, 70-74.
- Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 16th Edition, Washington, 1985.
- Tisler, T. 1987. Prispevek k metodologiji ocenjevanja strupenosti odpadnih vod s testnimi organizmi. Magistrski naloga. Ljubljana, BF, Oddelek za biologijo.