

## DOPRINOS ODREĐIVANJU TOKSIČNOSTI OTPADNIH VODA

J. ZAGORC-KONČAN, M. DULAR i J. ŽERJAV

*Kemijski inštitut »Boris Kidrič« i Fakultet za privredne nauke i tehnologiju  
Univerziteta, Ljubljana*

*(Primljeno 10. III 1978)*

Za određivanje toksičnosti otpadnih voda u našem laboratoriju uveli smo Offhausovu metodu. Upotrebljavamo Warburgov aparat i manometrijsku tehniku rada, odnosno Sapromat i volumetrijsku tehniku rada. Obje su aparature jako skupe i nisu dostupne svim industrijskim vodnim laboratorijama. Zbog toga smo pokušavali uvesti metodu prema Borovičkovej i Zahrádku koja se koristi jednostavnim aparatima. Rezultati uspoređivanja pokazuju da je metoda prema Borovičkovej i Zahrádku za određivanje toksičnosti odnosno inhibicijskih efekata otpadnih voda nesigurna pa je zbog toga ne preporučujemo.

Industrijske otpadne vode sadržavaju u mnogim slučajevima tvari koje utječu inhibitorno na biološke procese u vodotoku ili u uređaju za prečišćavanje. Poznavanje toksičnosti odnosno inhibicijskih efekata značajno je za vrednovanje i ocjenu štetnosti otpadne vode kao i prilikom planiranja i kontrole djelovanja biološkog uređaja za pročišćavanje.

Za određivanje toksičnosti poznato je više metoda: mikrobiološke (1), biološke (2), test sa ribama (3, 4) i razne respirometrijske metode (5, 6, 7, 8). Toksičnost izražavamo razmjerom razređivanja kod kojeg više ne nalazimo toksične utjecaje na testne organizme. Respirometrijska mjerenja omogućavaju postotno izražavanje inhibiranja biološke razgradnje.

U svom laboratoriju imamo izrađenu Offhausovu metodu (9, 10) za određivanje toksičnosti odnosno inhibicijskih efekata; laboratorijskim pokusima (Sapromat, Warburg) odredimo potrebno razrjeđenje kod kojeg otpadna voda ne djeluje više inhibitorno na prisutne mikroorganizme. Slijedi eksperimentalno provjeravanje čišćenja otpadnih voda u modelnim i polindustrijskim uređajima.

Pri istraživanju toksičnosti industrijskih otpadnih voda široka upotreba klasične manometrijske tehnike (Warburg, Sapromat) nije uvijek moguća zbog relativno visoke cijene aparata. Zbog toga smo željeli ispitati jednostavniju metodu koja bi bila prikladna i dostupna jedno-

stavnije opremljenim laboratorijama. Takva je, na primjer, metoda prema *Borovičkovo*j i *Zahradku* (11).

Ovaj rad donosi usporedbu rezultata dobivenih različitim metodama — *Offhausovom* i *Borovičkove* — i različitim aparaturama — Warburgom, Sapromatom, aparaturom *Borovičkove*.

## APARATI I METODE

### *Aparati*

#### *Warburg* (12, 13)

Warburgova metoda je manometrijska metoda gdje se mjeri potrošnja kisika izravno mjerenjem promjene tlaka koja nastaje zbog potrošnje kisika kada su volumen i temperatura stalni. CO<sub>2</sub> koji je nastao reakcijom apsorbira se u lugu tako da je smanjenje tlaka u reakcijskoj tikvici samo posljedica potrošnje kisika. Tikvica se kreće u termostatiranoj posudi. Nakon dovoljnog broja očitanih vrijednosti promjene tlaka možemo rezultate unijeti u dijagram i u obliku krivulje prikazati tok biološkog procesa u ovisnosti o vremenu.

#### *Sapromat* (14, 15).

Sapromat metoda je volumetrijska metoda. Uzorak se nalazi u zatvorenoj termostatiranoj posudi te se miješa magnetnom miješalicom. Potrošeni kisik uzrokuje smanjenje tlaka (nastali CO<sub>2</sub> se apsorbira u lugu). Svaki element je povezan sa stanicom koja elektrolitski oslobađa toliko kisika koliko se utrošilo prilikom razgradnje. Množinu potrošenog kisika aparat kulometrijski automatski registrira. Zbog većeg volumena uzorka, koncentrirane otpadne vode, dovoljne množine kisika koja je na raspolaganju i zbog kontinuirane registracije potrošnje kisika točnost je mjerenja vrlo dobra.

#### *Aparatura prema Borovičkovo*j i *Zahradku* (11)

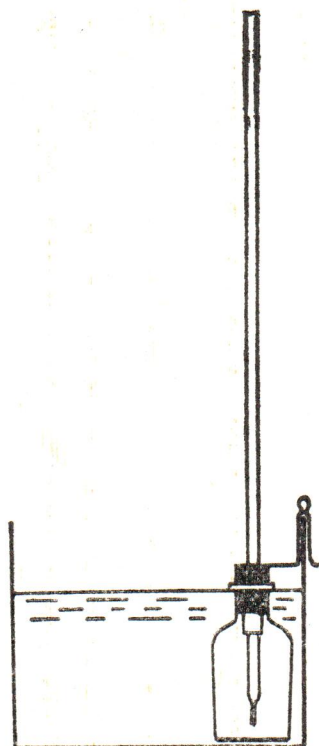
Aparatura prema *Borovičkovo*j i *Zahradku* vrlo je jednostavna. Sastavljena je od 50 mililitarske reagensne bočice sa brušenim vratom koji se hermetično zatvara gumenim čepom. Kroz čep je potisnuta dvomililitarska građuirana pipeta koja gotovo doseže dno bočice te služi kao manometar. Na pipeti ispod čepa pričvršćena je traka filtriranog papira koji je natopljen s KOH za apsorpciju CO<sub>2</sub>. Zatvorene bočice sa 10 ml uzorka u vrijeme pokusa u termostatu miruju.

### *Metode*

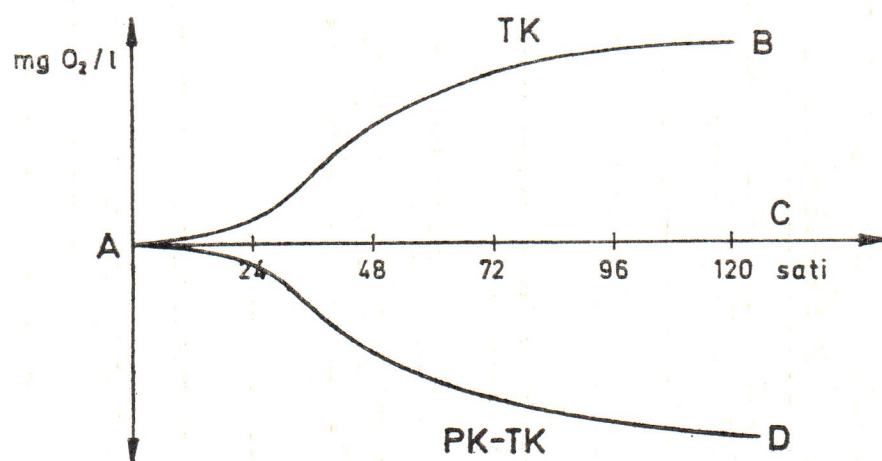
#### *Offhausova metoda* (9, 10)

Metoda se temelji na kontinuiranom mjerenju biokemijske potrebe za kisikom i na usporedbi krivulja BPK:

- nepoznatog uzorka
- otopine peptona (netoksična, dobro razgradljiva tvar)
- mješavine (otopina peptona i nepoznatog uzorka)



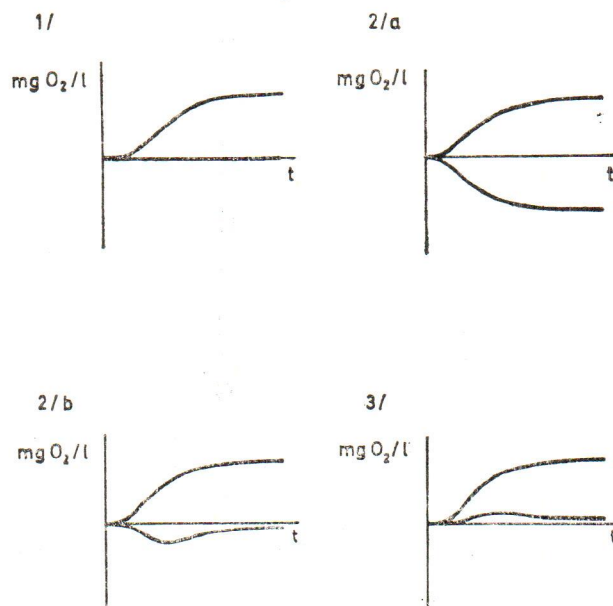
Sl. 1. Vodena kupka s pričvršćenom reagensnom bočicom



Sl. 2. Određivanje toksičnosti prema Offhausovoj metodi



Gornja krivulja TK na sl. 2 predstavlja teoretsku vrijednost (svota krivulja BPK nepoznatog uzorka i BPK otopine peptona). Donja krivulja PK — TK predstavlja razliku između praktične vrijednosti (BPK mješavine) i teoretske vrijednosti. Na osnovi uspoređivanja objiju krivulja (TK i PK — TK) odredimo toksičnost ili inhibicijske učinke uzorka na tok biokemijske razgradnje (sl. 3)



Sl. 3. Tipovi krivulja inhibicije razgradnje prema Offhausovoj metodi

1. bez inhibicije
- 2a. potpuna inhibicija (toksičnost)
- 2b. djelomična inhibicija
3. stimulacija

1. Kada krivulja PK — TK leži na apscisi, uzorak nema nikakva utjecaja na tok biokemijske razgradnje.
2. Kada krivulja PK — TK leži ispod apscise, u uzorku su prisutne tvari koje su toksične ili inhibiraju tok biokemijske razgradnje.
  - a) ako PK — TK leži ispod apscise te je u ordinatnom sistemu zrcalna slika krivulje TK, radi se o toksičnosti. U uzorku su prisutne toksične tvari koje posve onemogućavaju razgradnju peptona. Potrošnja kisika za mješavinu u razdoblju od 120 sati (5 dana) u tom je slučaju nula. Inhibiranje biološke razgradnje je 100%;
  - b) ako mješavina pokaže potrebu za kisikom koja je manja od TK govorimo o inhibiranju biološke razgradnje.

Plohu ispod apscise nazivamo plohom inhibiranja. Planimetri-ranjem pojedinih ploha možemo inhibicijski utjecaj uzorka izraziti u postocima.

$$\text{inhibiranje } \% = \frac{\text{ACD} \cdot 100}{\text{ABC}}$$

Toksičnost možemo odrediti i u pojedinim vremenskim intervalima, a interpretacija rezultata u obliku dijagrama pokazuje cjelokupan tok inhibicijskog utjecaja.

3. Kada krivulja PK — TK leži iznad apscise, u uzorku su prisutne tvari koje stimuliraju tok biološke razgradnje.

#### *Metoda prema Borovičkovej i Zahrádku (11)*

To je direktna manometrijska metoda te se oslanja na određivanje promjena u toku biokemijske razgradnje koje uzrokuju dodaci istraživanih tvari u sintetičkoj otpadnoj vodi. Određujemo BPK u nepoznatom uzorku kojeg toksičnost tražimo i u sintetičkoj otpadnoj vodi. Sintetička otpadna voda je tipa komunalne otpadne vode te se sastoji od otopina glukoze, peptona i fosfata. Predstavlja brzo razgradljivu, netoksičnu tvar. Zbog inhibicijskih utjecaja uzorka na djelovanje mikroorganizama sintetička otpadna voda razgrađuje se samo djelomično, zbog toga je udio BPK sintetičke vode u mješavini sa istraživanom vodom niži nego u kontrolnom uzorku gdje toksične tvari nisu prisutne. Metoda pretpostavlja da je razgradnja organskih tvari u sintetičkoj vodi (komunalnoj) monomolekularna reakcija, zbog toga u semilogaritamskom koordinatnom sistemu daje pravac. Za uzorak i sintetičku otpadnu vodu povučemo pravce, i na osnovi uspoređivanja toka obaju pravaca odredimo toksičnost ili inhibicijske učinke uzorka na tok biokemijske razgradnje.

#### *Priprema otopina*

##### *A. Priprema otopina za pohranu (Vorratslösungen)*

1. Otopina glukoza-pepton (GP-otopina)

5 g glukoze i 7,5 g peptona otopimo u 500 ml destilirane vode s NaOH dovedemo otopinu na pH = 8. Otopinu poslije filtriramo i frakcionirano steriliziramo u posudama koje imaju čep od vate.

2. Otopina fosfata

Liebmannovu otopinu 1 razrijedimo destiliranom vodom u omjeru 1:10.

Liebmannova otopina 1:   8,5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                                   21,75 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
                                   33,4 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
                                   1,7 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$

## 3. Voda za razrjeđivanje

Aerirana voda (vodovodna voda, koju smo aerirali 24 sata i onda ostavili da stoji 3 sata) kojoj dodamo po 1 ml/l Liebmannovih otopina 2, 3 i 4.

Liebmannova otopina 2: 22,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Liebmannova otopina 3: 27,5 g/l  $\text{CaCl}_2$

Liebmannova otopina 4: 0,25 g/l  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

## B. Priprema sintetične otpadne vode

## 1. GP-koncentrat

Za svaki pokus pripremimo svježi koncentrat, i to od:

16 ml destilirane vode

3 ml GP otopine

1 ml otopine fosfata

## 2. Sintetična komunalna otpadna voda:

Upotrebljava se kao neotrovna, lako razgradljiva voda (kontrola), koja je konstantna sastava a dobiva se od:

1 ml GP-koncentrata

8 ml vode za razrjeđivanje

1 ml inokuluma.

## C. Priprema inokuluma

1 ml GP-koncentrata

8 ml vode za razrjeđivanje

1 ml filtrirane komunalne otpadne vode.

Tako dobiveni inokulum termostatiramo (na 20 °C s pasažom) 2 puta 24 sata

Za svaki se pokus pripremi svježi inokulum.

*Postupak*

Pri svakom pokusu trebamo dvije bočice za termobarometarsku kontrolu, četiri bočice za sintetičnu otpadnu vodu i četiri bočice za svaku koncentraciju ispitivane materije.

Termobarometarsku kontrolu pripremimo tako da u bočice otpipetiramo 10 ml destilirane vode i dodamo kap 20% -tne otopine NaCl.

Sintetičnu otpadnu vodu pripremimo kako je već opisano.

Uzorak pripremimo od:

1 ml GP-koncentrata

8 ml ispitivane otopine ili industrijske otpadne vode koja je po potrebi razrijeđena vodom (za razrjeđivanje)

1 ml inokuluma.

U bočice otpipetiramo 10 ml uzorka. Kroz čep gurnemo graduiranu pipetu i direktno pod čep pričvrstimo 0,5 cm širok komad filtrir-papira, koji natopimo otopinom NaOH (apsorpcija  $\text{CO}_2$ ). Bočice hermetički za-



tvorimo tako da su pipete u toku pokusa zaronjene u tekućinu. Sve skupa termostatiramo u vodenoj kupelji na 20 °C. Kroz pipete utisnemo malo zraka da bismo dobili nadtlak koji potiskuje uzorak u pipete.

Termostatiramo oko 30 minuta, to jest dok se temperatura ne ustali i onda počnemo mjerenjem. Promjene tlaka zbog potrošnje kisika u bočicama očitavamo na pipeti kao promjenu visine nivoa, dok nam termobarometar služi za korekciju promjene atmosferskog tlaka.

Potrošnju kisika izračunamo po jednadžbi:

$$\text{mg O}_2/1 = K \cdot V$$

V — korigirana promjena volumena zraka (ml)

K — konstanta sistema (4 bočice) koju izračunamo iz prosječnih vrijednosti  $\bar{V}_z$  i  $\bar{s}$ :

$$K = 133 \left( 1 + \frac{\bar{s} \cdot \bar{V}_z}{p_0} \right)$$

$\bar{V}_z$  — prosječni volumen zraka nad uzorkom (ml)

$\bar{s}$  — prosječna dužina 1 ml na pipeti (cm)

$p_0$  — tlak zraka u termobarometru (1033 cm H<sub>2</sub>O)

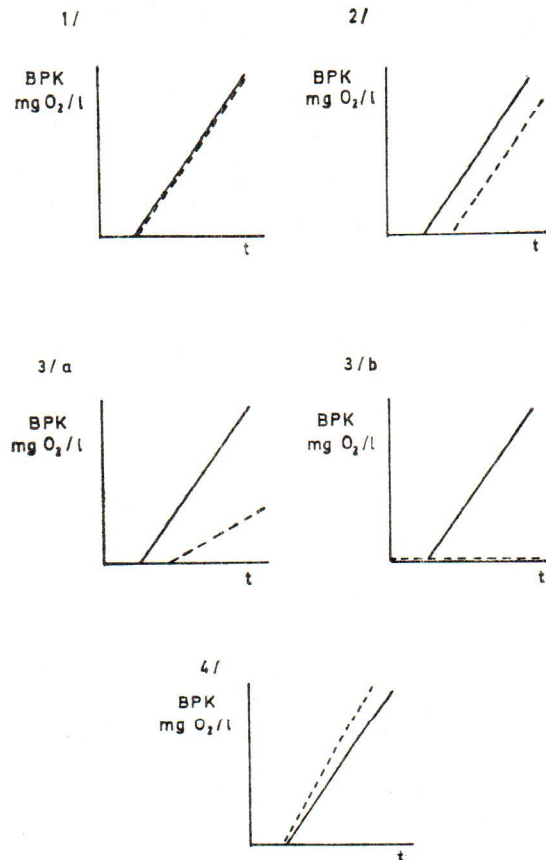
Količinu potrošenog kisika izračunamo posebno za svako mjerenje i rezultate unesemo u dijagram.

Pretpostavljamo da je biokemijska oksidacija monomolekularna reakcija, čiji tok crtamo na semilogaritamskom sistemu kao pravac.

Na linearni dio dijagrama nanosimo BPK u mg O<sub>2</sub>/1, u logaritamski dio, a vrijeme u satima.

Pravce toka BPK-a nacrtamo za sintetičnu otpadnu vodu i za ispitivane uzorke. Uspoređivanjem tih pravaca utvrđujemo efekt ispitivane tvari.

1. Ako se pravci (za uzorak i kontrolu) praktično pokrivaju, uzorak nema nikakva utjecaja na tok biokemijske oksidacije.
2. Ako pravac za uzorak ide usporedo s pravcem za sintetičku otpadnu vodu (kontrola), a vremensku os siječe kod više vrijednosti, zaključujemo da uzorak ima trenutačni toksični utjecaj na sposobnost oksidacije mikroorganizama. Nakon određenog vremena ovi se organizmi prilagode na nove uvjete.
- 3a. Ako pravac za uzorak ide manje strmovito nego pravac za kontrolu, a vremensku osovinu siječe kod mnogo više vrijednosti, zaključujemo da uzorak pokazuje toksično djelovanje na mikroorganizme, inhibirajući njihovo djelovanje.
- 3b. Za tvari koje su toksične (unište mikroorganizme) pravac za BPK ide usporedo s vremenskom osovinom, dakle nigdje ju ne siječe.
4. Ako pravac za uzorak ide strmije nego pravac za kontrolu, zaključujemo da uzorak stimulira tok biokemijske razgradnje (sl. 4).



Sl. 4. Tipovi krivulja inhibicije razgradnje prema metodi Borovičkove i Zahradka (\_\_\_\_\_ kontrola, ..... uzorak)

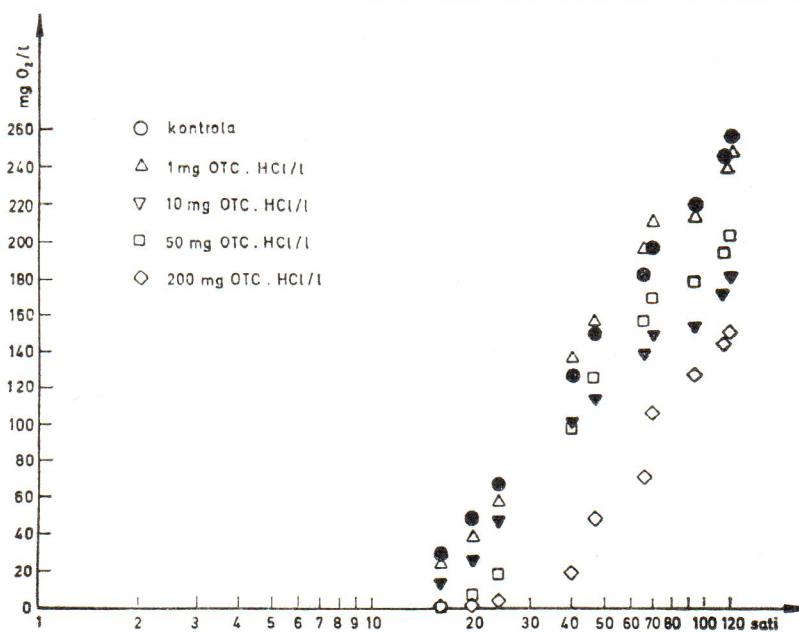
1. bez inhibicije
2. trenutačna inhibicija, kasnije adaptacije
- 3a. djelomična inhibicija
- 3b. potpuna inhibicija
4. stimulacija

#### REZULTATI I DISKUSIJA

Za testiranje metode prema *Borovičkovej* i *Zahradku* upotrijebili smo otopine oksitetraciklina hidroklorida (OTC. HCl) sa slijedećim koncentracijama: 1 mg, 10 mg, 50 mg, 200 mg OTC.HCl/l. Rezultate dajemo u obliku dijagrama (sl. 5). Dijagram prikazuje slijedeće:

- da tačke kod pojedinih određenja nisu na pravcu nego su rasipane
- da koncentriranje otopine antibiotika pokazuju manju toksičnost jer pravci imaju veći nagib (veći  $\text{tg}\alpha$ )





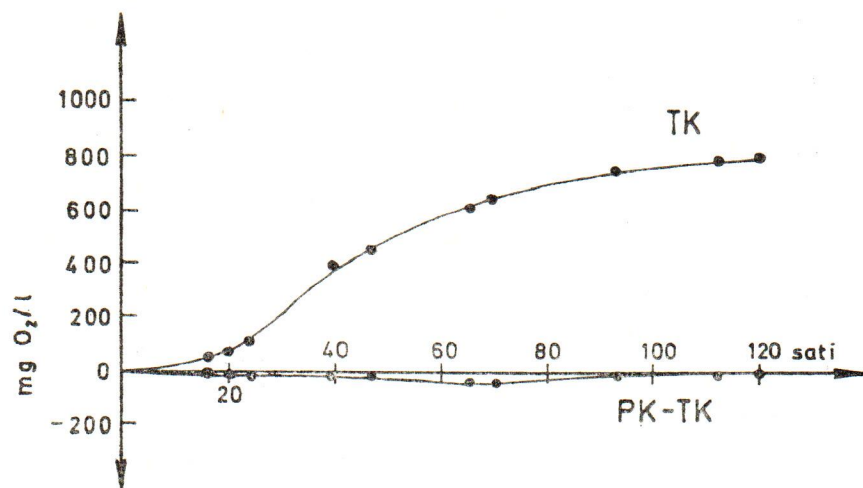
Sl. 5. Određivanje toksičnosti otopina OTC·HCl prema metodi Borovičkove i Zahradka

— da otopine s većom »lag-periodom« (200 mg/l OTC·HCl), što upućuje na veću toksičnost, imaju istodobno veći nagib (veći  $t_{ga}$ ), što upućuje na manju toksičnost. Dokazali smo da rezultati nisu odgovarajući, i to na taj način što smo iste uzorke obradili prema Offhausovoj metodi u Warburgovu aparatu. Rezultati su dati u obliku tablice 1 te na slikama 6—9.

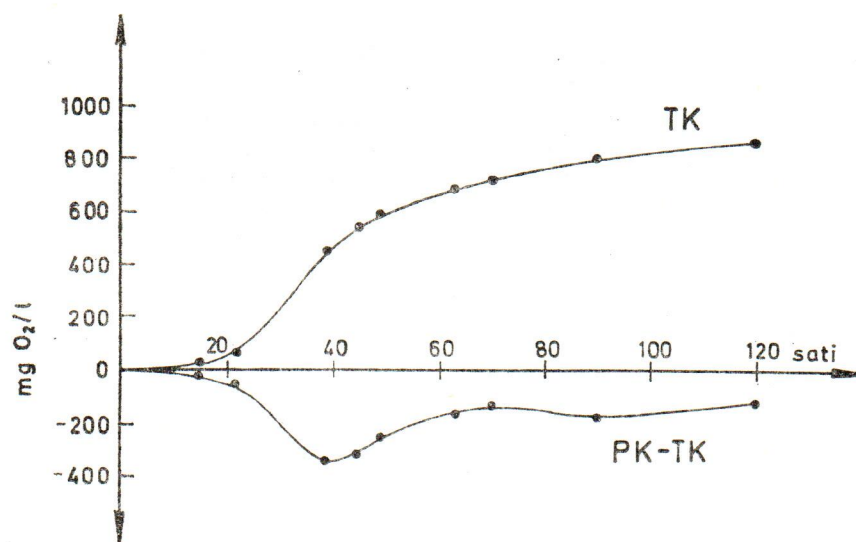
Tablica 1

Inhibiranje biološke razgradnje otopina OTC·HCl prema Offhausovoj metodi

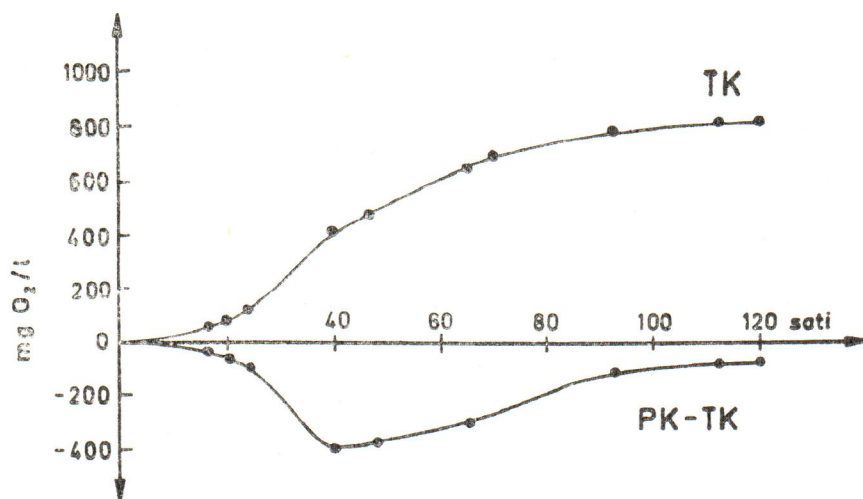
Koncentracija OTC·HCl (mg/l)	% inhibiranja
1	4
10	27
50	34
200	92



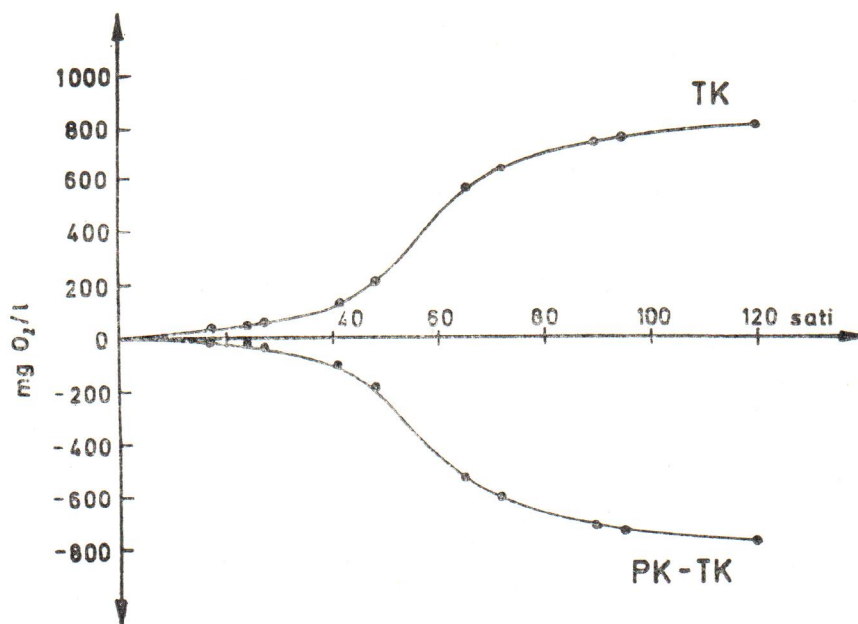
Sl. 6. Inhibiranje biološke razgradnje prema Offhausovoj metodi (otopina 1 mg OTC · HCl/l — inhibicija 4%)



Sl. 7. Inhibiranje biološke razgradnje prema Offhausovoj metodi (otopina 10 mg OTC · HCl/l — inhibicija 27%)



Sl. 8. Inhibiranje biološke razgradnje prema Offhausovoj metodi (otopina 50 mg OTC·HCl — inhibicija 34%)



Sl. 9. Inhibiranje biološke razgradnje prema Offhausovoj metodi (otopina 200 mg OTC·HCl — inhibicija 92%)



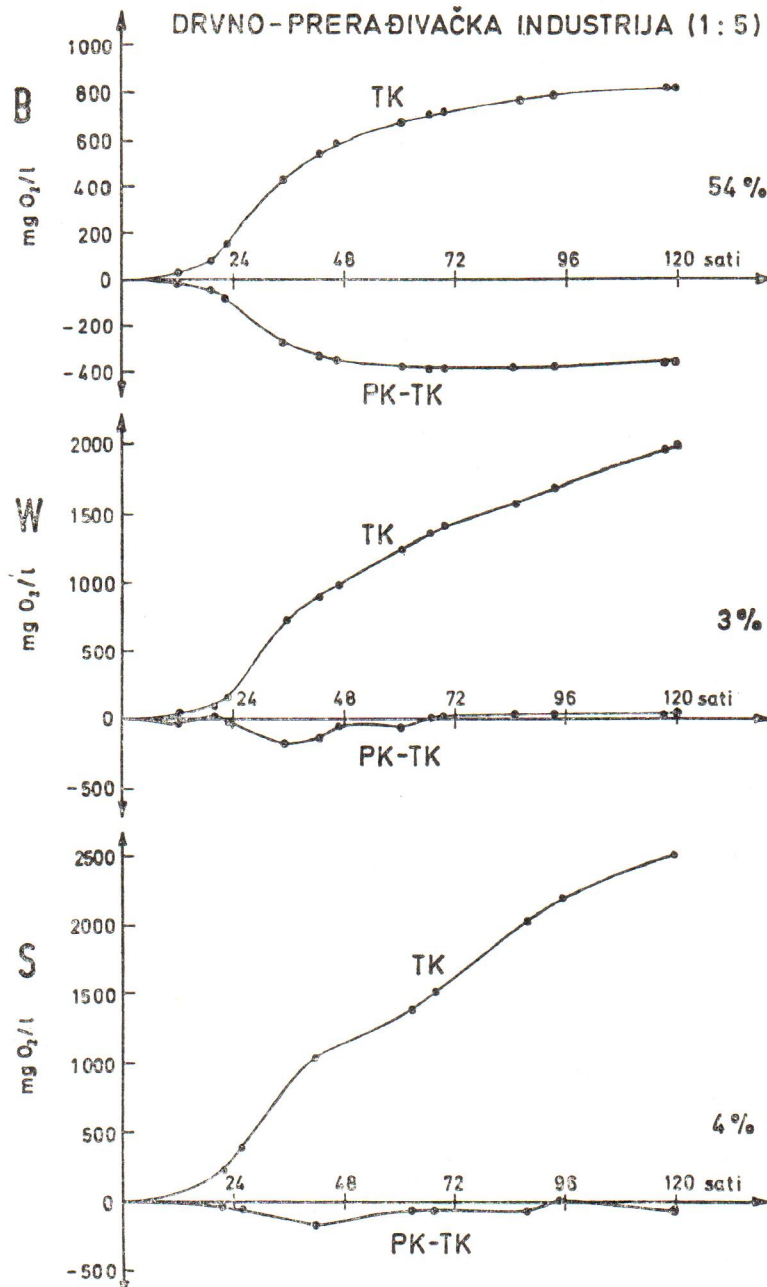
Rezultati koji su dobiveni u aparaturi *Borovičkove* pomoću metode *Borovičkove* nisu zadovoljili. Budući da je sama aparatura vrlo jednostavna, željeli smo u njoj ispitati *Offhausovu* metodu. Za studij i uspoređivanje toksičnosti u različitim aparaturama izabrali smo otpadne vode drvno-prerađivačke industrije te farmaceutske industrije. Obje otpadne vode smo uz različita razrjeđenja obradili na Warburgu (W), Sapromatu (S) i aparaturi *Borovičkove* (B). Kod primjene *Offhausove* metode na aparaturi *Borovičkove* i *Zahradke* umjesto dva priredili smo tri uzorka, tj. otpadne vode, otopine peptona i smjese otpadne vode s otopinom peptona. Rezultati su dani u obliku tablice 2 i dijagrama u sl. 10 i 11.

Tablica 2

*Inhibiranje biološke razgradnje otpadnih voda drvne prerađivačke industrije i farmaceutske industrije u različitim aparaturama*

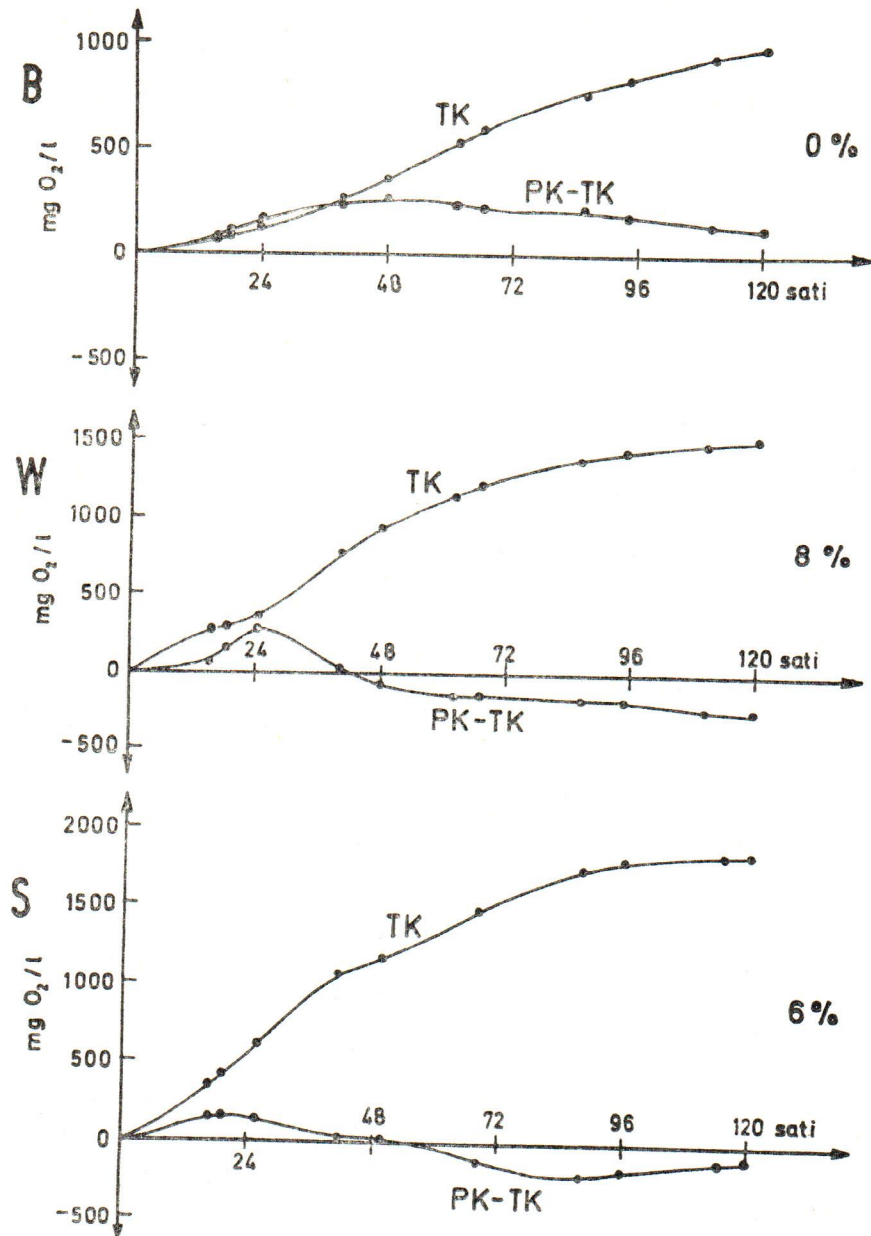
Otpadna voda	Razrjeđenje	Borovičkova aparatura	Warburg	Sapromat
drvna prerađivačka industrija	1 : 3	44	5	5
	1 : 5	54	3	4
	1 : 10	30	0	2
farmaceutska industrija	1 : 2	0	8	6
	1 : 3	11	0	0
	1 : 5	4	0	0

Eksperimentalna istraživanja pokazuju da se rezultati za određivanje toksičnosti odnosno inhibicijskih efekata *Offhausovom* metodom u Warburgovu aparatu i Sapromatu međusobno prilično dobro podudaraju. Ista metoda zakazuje u aparaturi prema *Borovičkovej*. Uzrok tome je što su eksperimentalni uvjeti sasvim drukčiji nego u Warburgu i Sapromatu. U Warburgu i Sapromatu istraživani se uzorak zbog stalnog kretanja miješa sa zrakom i time se povećava apsorpcija kisika. U aparaturi *Borovičkove* uzorak miruje i zbog toga je na raspolaganju manja površina za prijelaz kisika iz zraka u tekućinu. Osim toga je nekoliko uzoraka u pipeti (do 2 ml) gdje su uvjeti razgradnje drukčiji nego u bočici. Značajna je i količina taložljivih djelića u otpadnoj vodi. U Warburgovu aparatu i Sapromatu ovi stalno dispergirani djelići nalaze se u tekućini, a u aparaturi *Borovičkove* talože se na dnu te su tako izvrgnuti lošijim uvjetima razgradnje.



Sl. 10. Inhibiranje biološke razgradnje otpadne vode drvnoprerađivačke industrije uz razrjeđenje 1:5 prema Offhausovoj metodi u aparaturi Boro-vičkove (B), u Warburgovu aparatu (W) i u Sapro-matu (S)

FARMACEUTSKA INDUSTRIJA (1:2)



Sl. 11. Inhibiranje biološke razgradnje otpadne vode farmaceutske industrije uz razrjeđenje 1:2 prema Offhausovoj metodi u aparaturi Borovičkove (B), u Warburgovu aparatu (W) i u Sapromatu (S)



## Literatura

1. *Robra, K. H.*: Bewertung toxischer Wasserinhaltsstoffe aus ihrer Inhibitorwirkung auf die Substratoxydation von *Pseudomonas* Stamm Berlin mit Hilfe polarographischer Sauerstoffmessungen, GWF/Abw. 116 (1975).
2. *Bringmann, G.*: Gesundheits-Ingenieur, 80 (1959) 115.
3. *Liebmann, H.*: Die Wasserwirtschaft, 55 (1965) 219, 304.
4. *Poels, C. L. M.*: Contrôle automatique et continu de l'eau de surface par des poissons, La Tribune du Cebedeau (Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux), (1975), No. 381—382, 308—313.
5. *Verstraete, W., Voets J. P., Vanlooocke R.*: Water Res., 8 (1974) 1077.
6. *Remiche, C.-Van der Wielen*: Quelques considérations concernant l'utilisation du »Sapromat« pour la mesure de la toxicité, La Tribune du Cebedeau (Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux), (1975), No. 381—382, 314—319.
7. *Kool, K. J.*: Quelques techniques pour mesurer les effets toxique des polluants chimiques dans l'eau, La Tribune du Cebedeau (Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux), (1975), No. 383, 348—358.
8. *Blok, J.*: Water Res., 8 (1974) 11.
9. *Offhaus, K.*: Z. Wasser und Abwasser Forschung, 5 (1969) 1971.
10. *Offhaus, K.*: Beurteilung der Abwasserreinigung durch analytische Verfahren, Stand und Entwicklung der Abwasserreinigung, Münchener Beiträge zur Abwasser, Fischerei und Flussbiologie, Bd. 24, R. Oldenbourg, München, Wein (1973), 169—196.
11. *Borovičková, A., Zahrádka, V.*: Technologie vody 8 (1964) 393.
12. *Umbreit, W. W., Burris, Stauffer*: Manometric techniques, Burgess Publishing Co., Minneapolis 15, Minn (1964).
13. *Koelle, O.*: Manometrie, B. Braun, Apparatebau Melsungen, (1969).
14. *Liebmann, H., Offhaus, K.*: Volumetrische BSB-Messungen mit Hilfe des »Sapromaten« einem neuen Gerät zur Bestimmung des biokemischen Sauerstoffbedarfs (BSB<sub>5</sub>) und der Toxizität, Sonderdruck aus »Abwassertechnik« Folge 3 (1966), 4—6.
15. *de Brabander, K., Vandeputte, H.*: Evaluation quantitative de l'influence des décharges et des substances atteignant les eaux de surface, sur le pouvoir auto-épurateur de celles-ci, La Tribune du Cebedeau (Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux), (1971), No. 329.

## Summary

## CONTRIBUTION TO THE WASTEWATER TOXICITY DETERMINATION

The Offhaus method for the wastewater toxicity determination was introduced in our laboratory. The determination can be carried out by Warburg apparatus and manometric technique of work or Sapromat and volumetric technique of work. Both apparatuses are rather expensive and therefore not easily available to all the industrial water laboratories. On that account we tried to introduce the method of Borovičková and Zahrádka which requires a simple equipment. Unfortunately the comparative results show that the method of Borovičková and Zahrádka of the waste water toxicity determination is unreliable and therefore cannot be recommended.

Faculty of Natural Sciences and  
Technology and Institute  
»B. Kidrič«, University, Ljubljana

Received for publication  
March 10, 1978.

