

*Radovan Erben i Bosiljka Beader*  
Zoologijski zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilišta u Zagrebu

UTJECAJ NEKIH PETROKEMIJSKIH SPOJEVA NA PREŽIVLJAVANJE PUZEVA *LYMNAEA STAGNALIS* L. I *RADIX PEREGRINA* MÜLL. (PULMONATA)

**Abstract**

A few data about toxic effect of some petrochemical products on freshwater invertebrates, induced us to continue such investigations with various groups and species of animals. Species *Lymnaea stagnalis* L. and *Radix peregrina* Müll. are very frequent in our aquatic ecosystems, so we believed them to be, with their reactions to unfavourable conditions, rather convenient for experiments with the examined petrochemicals.

**Uvod**

Za vrijeme proizvodnje petrokemijski spojevi s industrijskim otpadnim vodama dospijevaju u površinske i podzemne vode. Kod visokih koncentracija biorazgradnja je zakočena, pa se ti spojevi dugo zadržavaju u vodama i tlima, iako mnogi od njih hlape. Mnoge naše vode na kopnu prilično su opterećene različitim petrokemikalijama i preko dozvoljenih granica (Jakovljević, 1966, Munjko, 1974).

Dok o djelovanju petrokemijskih spojeva na ribe postoje mnogi podaci (Pickering et Henderson, 1966, Fogels et Sprague, 1977 i mnogi drugi) beskrajšniji su dosta zanemareni u nekim ispitivanjima, osim u djelovanju fenolnih komponenta (Aleksjev, 1973, Chandler et Marking, 1975, Briggmann et Kühn, 1977).

U našim istraživanjima koristili smo hlapive spojeve aceton i kumen i topivi akrilonitril, koji se mnogo proizvode, a nisu ispitivani u svom djelovanju na niže vodene organizme. Zato smo za naše pokuse izabrali vrste *Lymnaea stagnalis* i *Radix peregra*, koje su tipični stanovnici voda na kopnu, a susrećemo ih na terenskim istraživanjima u različitim vodenim ekosistemima. Ovi pokusi nadovezuju se na naše prijašnje pokušaje u kojima smo nastojali ispitati toksično djelovanje ovih petrokemikalija na rakove (E r b e n et B e a d e r, 1982).

U pokusu su mjereni i određeni fizičko-kemijski faktori za koje se smatra da utječu na toksičnost petrokemijskih spojeva (Crandall et Goodnight, 1959, Brown et al. 1967, Whitley, 1968, Marking et Olson, 1975).

### Materijal i metode

Vrsta *Lymnaea stagnalis* sakupljena je u Botaničkom vrtu grada Zagreba u bari a *Radix peregra* u parku Maksimir iz jednog rukavca nalik na potok u kojem se zadržava voda od kiša. Nakon dopremanja u laboratorij životinje su ostavljene u vodi s terena u plastičnim posudama s prozračivanjem tokom 24 sata radi adaptacije. Drugi dan je po 10 životinja prebačeno u staklene kadice volumena 2 litre s odstajalom vodovodnom vodom i prozračivanjem. Broj kadica odgovarao je broju koncentracija, a jedna kadica je bila kontrolna za svaku vrstu posebno. Kod odabiranja životinja pazilo se da dobro reagiraju na podražaj i da budu približno iste veličine. Pokusi su trajali 96 sati a ponavljani su tri puta. Životinje nijesu hranjene za vrijeme trajanja pokusa.

Svakog dana mjerene su slijedeće fizičko-kemijske karakteristike vode: temperatura, količina otopljenog kisika, ukupna tvrdoća i pH. Svi faktori mjereni su metodom APHA (1967). U pokusu su upotrebljeni petrokemijski spojevi aceton, kumen i akrilonitril. Aceton i kumen dodavani su u volumnim postocima, a akrilonitril u težinskim koncentracijama. Akrilonitril je priređivan kao stock otopina od 8 gr/l vode, a zbog praktičnosti ćemo ga u daljnjem tekstu označavati samo kao AN. Čistoća ispitivanih spojeva bila je preko 99%, a nabavljeni su u tvornici INA-OKI Zagreb. Dodavane su slijedeće koncentracije spojeva:

		Koncentracije (% v/v) i mg/l AN			
		0,5	1	1,5	2
<b>L. stagnalis</b>	Spojevi aceton				
	kumen	0,005	0,01	0,05	0,1
	AN	0,04	0,064	0,12	0,16 0,24
<b>R. peregra</b>	Spojevi aceton	0,1	0,5	1	2
	kumen	0,005	0,01	0,05	0,1
	AN	0,04	0,08	0,16	

Svaki dan praćen je broj uginulih i živih jedinki. Prilikom ugibanja promatralo se ponašanje životinja.

### Rezultati

Temperatura vode u pokusu iznosila je 20 °C. Vrijednosti za pH kretale su se između 7 i 8, a za ukupnu tvrdoću oko 300 mg CaCO<sub>3</sub>/l.

Količina otopljenog kisika u pokusu s vrstom *R. peregra* kreće se u rasponu od 7 — 8,3 mg O<sub>2</sub>/l, a kod vrste *L. stagnalis* od 3,1 — 4,7 mg O<sub>2</sub>/l. Faktori izmjereni u kontroli, gotovo su isti s onima u pokusnim postavama, samo što su zabilježene nešto više vrijednosti za kisik. U kontroli nije bilo ugibanja.

Vrsta *R. peregra* pokazala je prilično veliku osjetljivost na ispitivane spojeve. U svim spojevima kod najviših koncentracija javlja se LD<sub>100</sub> već prvog dana pokusa. To su koncentracije acetona od 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v), kumena 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v) i AN-a od 0,16 mg/l (Tablica 1). Kumen se pokazao vrlo toksičan i u nižoj koncentraciji od 0,05<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v), gdje je LD<sub>100</sub> zabilježen nakon 24 sata, a zatim u manjim količinama kumena ugibanje teče sporije, da bi u najnižoj koncentraciji od 0,005<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v) preživjelo do kraja pokusa 80<sup>0</sup>/<sub>0</sub> jedinki.

Nakon početnog LD<sub>100</sub> u najvišoj koncentraciji acetona, javlja se LD<sub>50</sub> nakon 48 sati u koncentraciji od 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v), a zatim se ugibanje odvija postepeno, te u najnižoj koncentraciji od 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v) do kraja pokusa prežive gotovo sve jedinke.

AN se pokazao vrlo toksičan, jer osim spomenutog LD<sub>100</sub> već prvog dana trajanja pokusa, javlja se LD<sub>100</sub> i u nižoj koncentraciji od 0,08 mg/l nakon 72 sata, a do kraja pokusa u najnižoj koncentraciji preživi samo 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> jedinki.

Vrsta *L. stagnalis* pokazala se nešto otpornija na djelovanje ispitivanih spojeva. Kumen se ponovo pokazao kao vrlo toksičan i već nakon 24 sata u koncentraciji od 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v) dolazi do LD<sub>100</sub>. U ostalim koncentracijama preživi do kraja pokusa od 40<sup>0</sup>/<sub>0</sub> do 80<sup>0</sup>/<sub>0</sub> životinja (Tablica 2).

U acetonu se LD<sub>100</sub> dešava u najvišoj koncentraciji od 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v) tek nakon 72 sata. Također u istom vremenu, ali u nešto nižoj koncentraciji acetona od 1,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v), dolazi do LD<sub>50</sub>, a zatim ugibanje teče sporije i na kraju pokusa u najnižoj koncentraciji od 0,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (v/v) prežive sve jedinke.

AN se pokazao nešto slabije toksičan za vrstu *L. stagnalis*. Ni u koncentraciji od 0,16 mg/l ne ugibaju sve jedinke do kraja pokusa. Tek u koncentraciji od 0,24 mg AN/l događa se LD<sub>100</sub> nakon 24 sata.

Za vrijeme trajanja pokusa praćeno je ponašanje i način ugibanja puževa, koji se odvija u nekoliko faza:

1. Životinje pužu po dnu i stijenkama posude, a neke plivaju i na površini vode.
2. Nakon dodavanja kemikalija životinje postaju aktivnije i pokušavaju pobjeći iz posude.
3. U jaćim koncentracijama uvlaće tijelo dublje u kućicu i ispuštaju dosta sluzi.
4. U daljem toku pokusa slabije reagiiraju na mehanićke podražaje, osobito u višim koncentracijama. Kod vrste *L. stagnalis* mehanićkim podraživanjem dolazi do oštećenja i lomljenja kućice.
5. Životinje se jako izvlaće iz kućice i postaju neosjetljive. Neke potpuno izbacuju tijelo iz kućice.
6. Smrt.

#### Diskusija i zaključci

Pokusi obavljani s puževima *L. stagnalis* i *R. peregra* imali su svrhu da se ispita djelovanje acetona, kumena i akrilonitrila na preživljavanje životinja u eksperimentalnim uvjetima. Korištene vrste žive pretežno u čistim vodama u kojima nisu nađene nikakve kolićine petrokemijskih spojeva. Smatramo, ipak, da su ispitivane vrste bile prilićno indikativne za izvođenje ovakvih eksperimenata. Prilikom transporta s terena, životinje se smire i slabo reagiiraju na podražaje, međutim prebacivanjem u kadice s odstajalom vodom i prozraćivanjem one ponovo živnu i pokazuju normalne reakcije kakve su zapažene na terenu. Dobro podnašanje laboratorijskih uvjeta potvrćeno je i kontrolama.

Vrlo važna stvar u pokusima pokazalo se prozraćivanje. Bez prozraćivanja koncentracije kisika padaju tako nisko, da se postavlja pitanje koliki je udio kod ugibanja samih toksikanata, a koliko to uzrokuje pomanjkanje kisika. Zbog toga je nakon nekoliko provjeravanja bez aeracije, svuda uvedeno prozraćivanje. Osim toga, bez prozraćivanja voda se zamuti. To se osobito dešava kad koja životinja ugine. Tada se namnoži velik broj bakterija koje razgrađuju organske materije od ćega se voda još jaće zamuti (E r b e n, 1981). Kod puževa je to pojaćano zbog toga što oni izlućuju veće kolićine sluzi i produkte metabolizma.

Ostali faktori, pH i ukupna tvrdoća, nisu pokazali vidljivu korelaciju između ugibanja i toksićnosti ispitivanih spojeva. Iako neki autori u slićnim pokusima to navode (C l e m e n s et S n e e d, 1959, B o b r o v et S u d a k o v a, 1977) u našim pokusima nije primjećena nikakva zavisnost.

Od tri ispitivana spoja najtoksičniji se pokazao kumen. Koncentracije od 0,05 do 0,1% (v/v) izazivaju 100% mortalitet u toku 24 sata. Nakon kumena slijedi AN, koji je topiv u vodi, pa aceton koji je djelomično topiv. Teško je procijeniti toksičnost akrilonitrila, budući da ne postoje podaci o njegovom djelovanju na vodene organizme. O njegovom otrovnom djelovanju možemo zaključivati samo na osnovu podataka o otrovnosti sličnih spojeva topivnih u vodi (H i a t t et al. 1953, K a u f m a n, 1975). U usporedbi s tim spojevima možemo zaključiti da je AN izrazito toksičan, jer već koncentracija od 0,24 mg/l dovodi do 100% mortaliteta nakon prvog dana pokusa. AN djeluje direktno toksično, budući da je topiv u vodi. Intenzitet njegovog otrovnog djelovanja ovisit će o morfološkim i fiziološkim osobinama, što pokazuju i različiti stupnjevi ponašanja prilikom ugibanja eksperimentalnih životinja. Interesantno je, da dodavanjem određenih koncentracija AN-a dolazi do ugibanja pojedinih jedinki, a zatim dodavanjem sve viših koncentracija životinje ne pokazuju znakove uznemirenosti. Nakon izvjesnog vremena u letalnim koncentracijama slijedi naglo ugibanje, koje gotovo podjednako zahvaća sve životinje. Postoji vjerojatnost da životinje zbog slične tjelesne mase i brzine metabolizma, podjednako apsorbiraju AN sve do određene točke koja je nakon izvjesnog vremena letalna. Zbog toga i nije primjećena veća pravilnost prilikom trovanja akrilonitrilom.

Ostala dva ispitivana spoja djeluju također direktno toksično, iako je od njih jedino aceton djelomično topiv u vodi. Mehanizam njihovog neposrednog otrovnog djelovanja je teško utvrditi, iako je on iz naših pokusa uočljiv, osobito kod kumena. Iako se ovi spojevi zadržavaju na površini vode, povećanje mortaliteta tokom pokusa dovodi do zaključka da oni i na taj način djeluju jako otrovno. Ugibanje čak teče gotovo linearno za razliku od trovanja AN-om. Zadržavanjem na površini vode ovi spojevi priječe izmjenu plinova između vode i atmosfere. Aeracija je u našim pokusima spriječavala da količina kisika padne na minimum, ali uprkos tome dolazilo je do povećanog mortaliteta. Aceton mnogo jače hlapi od kumena i to smanjuje njegovu toksičnost. Dodavane su čak 20 puta veće koncentracije od kumena. U niskim koncentracijama to često omogućuje životinjama da prežive, međutim u visokim koncentracijama s usporenim ishlapljivanjem dolazi do povećanog mortaliteta, što je ustanovljeno i u našim pokusima.

Treba napomenuti da su ispitivane vrste *R. peregra* i *L. stagnalis* puževi plućnjaci. Zbog toga se često zadržavaju na granici između vode i zraka. To im koji puta omogućuje veće preživljavanje ukoliko je toksikant topiv u vodi, kao što je bio AN. Međutim, u slučaju da je otrovna tvar netopiva i pliva iznad vode (kumen) izlaženje na površinu više šteti nego koristi. U tom slučaju je direktno toksično djelovanje ovakvih otrova naročito izraženo.

Teško je točno odrediti otpornost životinja na toksično djelovanje ispitivanih spojeva. Radovi u kojima se iznose rezultati sličnih ispitivanja uglavnom opisuju načine ugibanja životinja i njihove reakcije (Alekseev, 1973). Postoje razmimoilaženja o tome da li je moguće precizno odvojiti pojedine reakcije životinja, točno ih klasificirati i na izvjestan ih način ozakoniti, odnosno reći da će u određenoj situaciji uz određenu koncentraciju spoja reagiranje životinje biti unaprijed definirano. Ponašanje ne može biti unaprijed definirano, ali neke konstante preživljavanja u akutnim ili u kroničnim uvjetima kod određenih koncentracija spojeva nakon ponovljenih pokusa, mogu biti sugerirane uz izvjesnu toleranciju pomaka od pretpostavljenog ponašanja. Ono što diferencira rezultate i udaljava ih od linearnosti to su morfološke i fiziološke karakteristike, koncentracija toksina i vrijeme njegova djelovanja. Ovim pokusima to je dobrim dijelom potvrđeno.

Tablica 1. Djelovanje petrokemijskih spojeva na vrstu  
*Radix peregra*

Table 1. The effect of the petrochemical products on the species  
*Radix peregra*

Ispitivani spojevi Examined compounds	Koncentracije u ‰ (v/v) i mg/l AN Concentrations in ‰ (v/v) and mg/l of AN	Sati Hours			
		24	48	72	96
		postotak smrtnosti mortality in percentage			
Aceton	0,1	0	0	0	10
	0,5	0	10	10	20
	1	30	50	60	80
	2	100	—	—	—
	0,005	0	0	10	20
Kumen	0,01	20	30	50	70
	0,05	100	—	—	—
	0,1	100	—	—	—
	0,04	10	40	80	90
AN	0,04	30	60	100	—
	0,16	100	—	—	—

Tablica 2. Djelovanje petrokemijskih spojeva na vrstu  
*Lymnaea stagnalis*

Table 2. The effect of the petrochemical products on the species  
*Lymnaea stagnalis*

Ispitivani spojevi Examined compounds	Koncentracije u ‰ (v/v) i mg/l AN Concentrations in ‰ (v/v) and mg/l of AN	Sati Hours			
		24 postotak smrtnosti mortality in percentage	48	72	96
Aceton	0,5	0	0	0	0
	1	0	10	10	10
	1,5	0	30	50	70
	2	30	60	100	—
	0,005	0	20	30	30
Kumen	0,01	0	20	30	40
	0,05	10	40	60	80
	0,1	100	—	—	—
	0,04	0	0	0	20
	0,064	10	20	20	30
AN	0,12	0	40	60	70
	0,16	30	40	70	80
	0,24	100	—	—	—

#### LITERATURA

- Alekseev, B. A. (1973): Toksikološkička karakteristika i simptom kompleksne ostro fenolne intoksikacije vodnih najekotičkih i paukobiljnih. Trudy Instituta biologii vnutremnih vod, Akad. nauk SSSR, 24, 72-89.
- APHA (1967): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 12th ed. Amer. Publ. Health Assoc., New York.
- Bobrov, O. G., Sudakova, B. B. (1977): Rezistentnost djetritofagov biofiltrir pri fenolnoj intoksikaciji. Hidrobiološkički žurnal, 13, 1, 71-74.
- Brown, V. M., Jordan, D. H. M. and Tiller, B. A. (1967): The effect of temperature on the acute toxicity of phenol to rainbow trout in hard water. Water Res., 1, 587-594.
- Bringmann, G. und Kühn, R. (1977): Befunde der Schädigung wassergefährdender Stoffe gegen Daphnia magna. Z. für wasser und Abwasserforschung, 10, 5, 161-166.
- Chandler, J. and Marking, L. L. (1975): Toxicity of the lampricide 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol (TEM) to selected aquatic invertebrates and frog larvae. Investigations in Fish Control 62, US Dept. Int. Fish Wildl. Serv., 3-7.
- Clemens, H. P. and Sneed, K. E. (1959): Lethal doses of several commercial chemicals for fingerling channel catfish. US Fish Wildlife Serv., Spec. Sci. Rept. Fish., No. 316. 100 pp.
- Crandall, C. A. and Goodnight, C. J. (1959): The effects of various factors on the toxicity of sodium pentachlorophenate to fish. Limnol. and Oceanogr., 4, 1, 53-56.

- Erben, R. (1981): Utjecaj akumulacije fenola na preživljavanje beskralješnjaka u vodama na kopnu. Disertacija, Sveučilište Zagreb.
- Erben, R. i Beader, B. (1982): Djelovanje kumena, acetona i akrilonitrila na rakove *Asellus aquaticus* L. i *Gammarus fossarum* Koch. (Isopoda, Amphipoda). Poljoprivreda i Sumarstvo, in print, Titograd.
- Fogels, A. and Sprague, J. B. (1977): Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. *Water Research*, 11, 811-817.
- Hiatt, R. W., Naughton, J. J. and Matthews, D. C. (1953): Effect of chemicals on a schooling fish *Kuhlia sandvicensis*. *Biol. Bull.*, 104, 28-44.
- Jakovljević, K. (1966): Pregled metoda dokazivanja fenolnih jedinjenja u vodi. — *Tehnika*, 21, 1, 24-26.
- Kaufman, Z. S. (1975): Certain aspects of phenol intoxication of *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) from the standpoint of stress theory. *Hydrobiological J.*, 11, 55, 44-46.
- Marking, L. L. and Olson, L. E. (1975): Toxicity of the lampricide TFM to nontarget fish in static tests. Invest. in Fish Control No. 61. US Dept. of Int. Fish Wildl. Serv., 1-9.
- Munjko, I. (1974): Određivanje fenola i ulja u površinskim opadnim vodama. bornik referata s V savetovanja »Otpadne vode«, Beograd, 101-123.
- Pickering, P. H. and Henderson, C. (1966): Acute toxicity of some important petrochemicals to fish. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 38, 9, 1419-1429.
- Whitley, L. S. (1968): The resistance of tubificid worms to three common pollutants. *Hydrobiologia*, 32, 1-2, 193-205.

Influence of some petrochemical products on the survival of the snails *Lymnaea stagnalis* L. and *Radix peregra* Müll. (Pulmonata)

R. Erben and B. Beader

Zoology Department, Faculty of Sciences, University Zagreb

### Summary

The influence of acetone, cumene and acrylonitrile on snails *Lymnaea stagnalis* and *Radix peregra*, was examined during 96 hours of exposure. The examined species were very sensitive to the influence of these compounds. Cumene caused a 100% death-rate with species *R. peregra* in the concentration of 0,05% (v/v), at the first day of the experiment, and for species *L. stagnalis* in concentration of 0,1% (v/v). After 24 hours of exposure 100% of *R. peregra* and *L. stagnalis* die in the concentrations of 0,16 and 0,24 mg/l of acrylonitrile.

Aceton which evaporates, caused mortality in higher concentrations, for both species LD<sub>100</sub> was at 2% (v/v).

The measured physico-chemical parameters of water: temperature, pH, total hardness, do not seem to have any influence on the toxic effect of the examined compounds. The only important factor was oxygen so we had the water aerated during the whole experiment.