

*Radovan Erben i Bosiljka Beader*  
*Zoolojski zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet*  
*Sveučilište u Zagrebu*

DJELOVANJE KUMENA, ACETONA I AKRILONITRILA NA RAKOVE *ASELLUS AQUATICUS* L. I *GAMMARUS FOSSARUM* KOCH. (ISOPODA, AMPHIPODA)

THE EFFECT OF CUMENE, ACETONE AND ACRYLONITRILE ON CRABS *ASELLUS AQUATICUS* L. AND *GAMMARUS FOSSARUM* KOCH. (ISOPODA, AMPHIPODA)

#### **Abstract**

The increasing production of the petrochemical compounds, increases its concentration in our freshwater system. This imposes the question — how they effect the lower aquatic organisms.

Being occupied with the invertebrates of running waters from the Karst area, we chose some typical and more frequent animals in the Karst waters area, to examine the influence of three petrochemicals on their organisms. For this we chose *Asellus aquaticus* L. and *Gammarus fossarum* Koch., supposed to be very indicative for such type of the experiment.

#### **Uvod**

Otpadne vode industrijskih postrojenja za preradu naftnih derivata u velikoj mjeri opterećuje različite vodene ekosisteme na kopnu. Općenito je poznato da su petrokemijski spojevi jako toksični u djelovanju na više organizme. To je utvrđeno ispitivanjima na ribama (Bodmer, 1945, Leclere et Devlaminck, 1950, Liebmann, 1960 i mnogi drugi), a primjećena je velika opasnost od trovanja i kod ljudi koji rade u pogonima za preradu ovih spojeva. Što se zbiva s beskralješnjacima kad ovi spojevi dospiju u recipjente nije poznato ili postoji vrlo malo podataka kao npr. Bach, 1929, Cairns et al. 1976, Semenova, 1972, Schultz et Dumont, 1977, Erben, 1978.

U nas ovakvim vrstama zagađenja nije još uvijek posvećena dovoljna pažnja. Zato smo i postavili zadatak da se ispita djelovanje često upotrebljivanih petrokemijskih spojeva na otpornost, odnosno stupanj mortaliteta vrsta *Asellus aquaticus* L. i *Gammarus fossarum* Koch. u odnosu na koncentraciju i vrijeme djelovanja dodanih spojeva, povezanih s određenim fizičko-kemijskim parametrima (Pawlaczyk — Szpilowa et al. 1972, Kawatski et al. 1974). Smatramo, da bi ispitivane vrste, koje su rasprostranjene u vodama na kopnu gotovo čitave Evrope, mogle predstavljati reprezentativni uzorak organizma, čija bi egzistencija bila jako i neposredno ugrožena eventualnim mogućim zagađenjem ovim spojevima.

#### Materijal i metod rada

Vrsta *Asellus aquaticus* sakupljena je u rijeci Gackoj, a vrsta *Gammarus fossarum* u rijeci Korani. Nakon dopremanja u laboratorij životinje su ostavljene 24 sata u plastičnim posudama s prozračivanjem u vodi s terena radi adaptacije. Poslije toga prebačene su u staklene kadice zapremine 2 litre. U kadicama se nalazila odstajala vodovodna voda koja je prozračivana 24 sata prije prebacivanja životinja, a prozračivanje je nastavljeno do kraja pokusa. U pokusu je bilo 10 životinja. Kod raspoređivanja životinja u kadicama, uzimana je u obzir veličina, pokretljivost i reakcija na mehaničke podražaje. Pazilo se da su životinje približno iste veličine, dobro pokretne i da reagiraju približno isto na mehaničke podražaje. Životinje nisu bile hranjene za vrijeme pokusa koji su trajali 96 sati. Broj kadica odgovarao je broju ispitivanih koncentracija, od kojih je jedna bila kontrolna.

Čistoća ispitivanih spojeva bila je preko 99%, a nabavljeni su u tvornici INA-OKI Zagreb. Aceton i kumen dodavani su u volumnim koncentracijama, a AN u mg/l iz stock otopine koja je priređivana otapanjem 8 gr AN-a u litri destilirane vode (akrilonitril će zbog praktičnosti u daljem opisivanju biti označen samo kao AN). Dodavane su slijedeće koncentracije spojeva:

Vrsta	Spoj	Koncentracije u ml/l i mg/l AN				
		0,1	0,5	1	1,5	3
A. aquaticus	Aceton	0,1	0,5	1	1,5	3
	Kumen	0,01	0,05	0,1	0,5	1
	AN	0,016		0,04		0,064
G. fossarum	Aceton	1	1,5	3	5	10
	Kumen	0,01	0,05	0,1	0,5	1
	AN	0,008	0,012	0,024	0,04	

Svaki dan kontroliran je broj uginulih jedinki. Prilikom ugibanja promatralo se ponašanje životinja. U toku pokusa mjerene su svakog dana fizičko-kemijske karakteristike vode: temperatura, količina otopljenog kisika, ukupna tvrdoća i pH. Svi parametri mjereni su metodom APHA (1967).

### Rezultati

Od fizičkih faktora mjerena je samo temperatura vode. Za obje vrste temperatura u pokusu bila je 20°C, dok je na terenu prilikom sakupljanja životinja zabilježeno 17°C. Životinje su se vrlo brzo prilagodile novom temperaturnom režimu, tj. povišenju od nekoliko stupnjeva u laboratorijskim uvjetima i pokazivale normalnu pokretljivost kakva je zapažena i na terenu.

Vrijednosti pH bile su slične u oba pokusa i kretale su se od 7-8.

Isto su se tako neznatno mijenjale vrijednosti za ukupnu tvrdoću i kretale se u rasponu od oko 300 mg CaCO<sub>3</sub>/l. Može se primjetiti lagano opadanje vrijednosti za tvrdoću prema kraju pokusa što nije jako izraženo.

Količina otopljenog kisika opada u toku pokusa. Najveće vrijednosti koncentracije kisika zabilježene su u pokusu s vrstom *A. aquaticus* i kretale su se od 7,8 do 8,6 mg O<sub>2</sub>/l, dok su kod vrste *G. fossarum* izmjerene vrijednosti od 3,5 do 4,7 mg O<sub>2</sub>/l.

Fizičko-kemijski faktori izmjereni u kontroli bili su slični onima u pokusnim postavama. Jedino su vrijednosti otopljenog kisika bile za 1-2 mg/l više. U kontroli nije bilo ugibanja za vrijeme trajanja pokusa.

#### Djelovanje petrokemijskih spojeva na vrstu *Asellus aquaticus*

Za ispitivanje djelovanja petrokemijskih spojeva na raka *A. aquaticus* korištene su relativno niske koncentracije acetona, kumena i AN-a. Međutim, svi ispitivani spojevi pokazali su prilično veliku toksičnost. Najtoksičniji pokazao se kumen, gdje već prvog dana trajanja pokusa u koncentracijama od 0,5 i 1 ml/l smrtnost dostiže 100% (Tablica 1). U ostalim koncentracijama ugibanja teče postepeno, tako da nakon 24 sata u koncentraciji od 0,1 ml/l ugiba još 20% jedinki. Znači smrtnost iznosi 70%. Koncentraciju od 0,01 ml/l preživljavaju sve jedinke prvog dana pokusa. Pri najnižoj koncentraciji u vremenu od 96 sati ugiba 30% jedinki, a povećanjem količine kumena i ta se vrijednost povećava, tako da nakon izlaganja koncentraciji od 0,05 ml/l, gdje za 96 sati uginu 70% jedinki, smrtnost u ostalim koncentracijama poraste do 100%.

Nešto slabiju toksičnost pokazao je AN, iako je LD<sub>100</sub> zabilježen nakon 48 sati u koncentraciji od 0,04 mg/l. U najnižoj kon-

centraciji ugibanje teče postepeno i polako se povećava do kraja pokusa, tako da mortalitet iznosi u prosjeku 20% dnevno.

Aceton se nije pokazao tako toksičan kao kumen i AN. Prvi dan trajanja pokusa u najnižoj koncentraciji od 0,1 ml/l sve jedinke preživljavaju i tek u koncentraciji od 3 ml/l ugiba 30% jedinki nakon 24 sata trajanja pokusa. LD<sub>50</sub> dešava se nakon 72 sata u koncentraciji od 1,5 ml/l acetona, a u koncentraciji od 3 ml/l nakon 72 sata LD iznosi 100%. To je ujedno i jedina koncentracija u kojoj je zapažen LD<sub>100</sub>, jer u nižim količinama acetona preživi više od polovine rakova do kraja pokusa.

#### Djelovanje petrokemijskih spojeva na vrstu *Gammarus fossarum*

Za raka *G. fossarum* korištene su približno iste količine spojeva kao i u pokusima s vrstom *A. aquaticus*. Upotrebljene su nešto veće količine acetona, jer je ova vrsta pokazala veću otpornost.

Najtoksičniji su se pokazali kumen i AN, gdje se LD<sub>100</sub> javlja već prvog dana pokusa u koncentracijama od 1 i 1,5 ml/l kumena i 0,024 do 0,04 mg/l AN-a. (Tablica 2). Nakon 48 sati i u koncentraciji od 0,1 ml/l kumena nalazimo LD<sub>100</sub>, a zatim se te vrijednosti snizuju, tako da u najnižoj koncentraciji kumena od 0,01 ml/l do kraja pokusa preživi 60% jedinki.

U akrilonitrilu dolazi do 100% mortaliteta u koncentraciji od 0,04 mg/l nakon 24 sata. Nakon 48 sati LD<sub>100</sub> događa se u 0,024 mg/l, dok u ostalim koncentracijama preživljavaju sve jedinke do kraja pokusa, ali pokazuju oslabljene reakcije i promjene ponašanja.

Aceton je i u pokusu s ovom vrstom pokazao nešto slabiju toksičnost od kumena i AN-a. LD<sub>100</sub> se prvi puta javlja nakon 48 sati u najvišoj koncentraciji od 10 ml/l. U ostalim, nižim koncentracijama ugibanje teče polaganije, gotovo linearno, dok su u najnižoj koncentraciji od 1 ml/l acetona sve jedinke preživjele do kraja pokusa.

Prilikom ugibanja praćeno je ponašanje životinja, te se ugibanje obje vrste rakova može opisati u nekoliko faza:

1. Prije dodavanja kemikalija rakovi pužu po dnu i stijenkama kadice i nakupljaju se na kamenu za prozračivanje.
2. Dodavanjem petrokemikalija povećava se aktivnost pokreta.
3. Nakon određenog vremena aktivnost se usporava i narušava se koordinacija pokreta.
4. Životinje padaju na leđa, rade grčevite pokrete i pokušavaju se vratiti u normalan položaj.
5. Dolazi do paralize organa koji imaju lokomotornu funkciju. Životinje ne regiraju na mehaničke podražaje.
6. Nastupa smrt.

## Diskusija

Ispitivane vrste pokazale su se pogodne za izvođenje eksperimenata, jer su dobro podnosile nove uvjete u laboratoriju što je potvrđeno kontrolnim postavama u kojima nije bilo ugibanja za vrijeme trajanja pokusa.

Temperatura vode je u ovim pokusima bila dovoljno visoka za normalan metabolizam životinja, tako da nismo imali dojam da eventualno utječe na pojačano ili smanjeno djelovanje ispitivanih spojeva.

Za cijelo vrijeme trajanja pokusa voda je bila prozračivana. Uvođenje prozračivanja u kadice bilo je neophodno, jer se dobiva dojam da životinje ugibaju zbog pomanjkanja kisika, isto kao i zbog toksičnog djelovanja spojeva. Vrijednosti koncentracije kisika padaju u pokusu s vrstom *G. fossarum* dosta nisko, 3,5 mg O<sub>2</sub>/l. Te vrijednosti su još niže ukoliko nema prozračivanja. Voda se tada zamućuje, osobito kad životinje ugibaju, a namnoži se i veći broj bakterija (E r b e n, 1978), tako da se na površini vode stvori sloj kože. Osim toga istalože se i određene količine vapnenca koji upotpunjuje taj površinski sloj kore. Ako tome dodamo da i petrokemijski spojevi, osobito oni netopivi, plivaju na površini vode, te također onemogućavaju izmjenu plinova, onda se opasnost od pomanjkanja kisika udvostručuje.

Podaci o vrijednostima pH i ukupne tvrdoće ne daju nam mogućnost da zaključujemo o njihovom utjecaju na promjenu toksičnosti ispitivanih spojeva. Iako se izmjerene vrijednosti ovih parametara podudaraju s vrijednostima drugih autora u srodnim pokusima (H e r b e r t, 1962, R y e i L o u i s, 1976, K a i l a i S a a r i k o s k i, 1977), naši pokusi nisu pokazali da postoji povezanost između ovih faktora i toksičnosti ispitivanih spojeva.

Sva tri spoja pokazala su se vrlo pogubna za ispitivane vrste. Najtoksičnije djelovanje ispoljio je kumen. Koncentracije od 0,5 do 1 ml na litru uništavaju sve jedinke u toku 24 sata. Čak i najmanje koncentracije od 0,01 do 0,05 ml na litru uzrokuju mortalitet između 20% i 40% jedinki kod ovih vrsta. To iznenađuje tim više, jer je poznato da kumen nije topiv u vodi. Kumen vjerojatno djeluje dvojako na ispitivane vrste. Budući da nije topiv u vodi on pliva na površini stvarajući tanji ili deblji film iznad vode, ovisno o koncentraciji, i na taj način prijeći izmjenu plinova između vode i atmosfere. Zbog toga će životinje jednim dijelom ugibati uslijed nedostatka kisika u čemu se očituje indirektno djelovanje ovog spoja. Međutim, u svim našim pokusima uvedena je aeracija, tako da količina otopljenog kisika nije nikad pala na izrazito niske vrijednosti. Izgleda da je kumen u uvjetima dobre aeracije ipak neposredno toksičan i da izaziva mortalitet u jako niskim koncentracijama već pri prvom kontaktu sa životinjama.

Prilikom dodavanja svakog spoja u pokusu kadice mi smo ih jednolično pomiješali u vodi sa staklenim štapićem. Smatramo da taj prvi kontakt uzrokuje veliko trovanje životinja od čega se one ne oporavljaju sve do kraja pokusa iako spoj brže ili sporije hlapi. Slično se dešava i u prirodnim uvjetima ukoliko dođe do naglog ispuštanja petrokemijskih spojeva u recipijent (npr. izljevi tvornica, brodova, cisterni itd.).

U prirodnim vodenim ekosistemima će ishlapljivanje nekog petrokemijskog spoja ovisiti o temperaturi, tlaku, jačini vjetra, vodenim strujama i drugo, što u eksperimentalnim uvjetima nije slučaj (Mastrović i Knežević, 1977). Uprkos tome što je kumen lakši od vode i što hlapi, njegovo zadržavanje na površini još uvijek izaziva veliku toksičnost. Mehanizam neposrednog djelovanja takvog spoja nije dovoljno ispitan, iako je on iz rezultata naših pokusa očit i može se utvrditi povećanjem mortaliteta tijekom pokusa i različitim ponašanjem životinja pod utjecajem ovog spoja.

Aceton je djelovao slično kao i kumen, međutim toksičnost mu je bila nešto slabija, iako je topiv u vodi, pa su dodavane veće koncentracije ovog spoja. Uzrok njegove smanjene toksičnosti je njegova velika hlapljivost. Budući da se dobrim dijelom otapa u vodi djeluje slično kao i mnogi toksikanti topivi u vodi. Kontakt sa životinjama je stalan i direktan, tako, da povećanjem koncentracija ugibanje često teče linearno. Način toksičnog djelovanja acetona također je teško utvrditi, međutim manje više linearno povećanje smrtnosti dodavanjem sve većih koncentracija otrova, ukazuje da ga životinje sve više apsorbiraju u zavisnosti s koncentracijom i vremenom izlaganja. Velika hlapljivost acetona omogućuje preživljavanje životinja u eksperimentalnim uvjetima, a i onih u prirodnim sredinama. Manje koncentracije brže ishlape, pa ne dolazi do velikog ugibanja životinja, a nakon ishlapljivanja preostale jedinke pokazuju normalno ponašanje. To se dobro vidi kod najnižih dodanih koncentracija od 0,1, 1 i 5 ml/l acetona, gdje je samo pojedinačno dolazilo do ugibanja u pokusu s vrstom *G. fossarum* i to svega 10% jedinki. Kod većih koncentracija povećavala se i topivost ovog spoja i usporavalo ishlapljivanje, tako da u konačnim uvjetima trovanja dolazi do 100% mortaliteta.

Teško je reći da li se u ovim pokusima AN pokazao kao vrlo toksičan spoj, budući da nema podataka o njegovom djelovanju na niže vodene organizme. Prema podacima iz literature o djelovanju sličnih spojeva na pojedine vrste i skupine beskralješnjaka iz vode na kopnu (Lebmänn, 1960) mogli bi reći da ispitivane vrste nisu pokazale veliku otpornost prema ovom otrovu. Ugibanje životinja pod utjecajem ovog spoja ne pokazuje veliku pravilnost. AN je topiv u vodi i ne hlapi. U vezi s tim će njegovo toksično djelovanje ovisiti o mogućnosti apsorpcije od strane životinja, što

opet ovisi o njihovom metabolizmu, odnosno morfološkim karakteristikama.

Sve životinje pokazivale su prilikom intoksikacije različite stupnjeve uzbuđenja, grčevita reagiranja, kao tipičnu reakciju na nepovoljne uvjete. Bio je to njihov način da pokušaju izbjeći toksični zonu, jedna od osnovnih prilagodbi ponašanja u promjenjivim, nepovoljnim uvjetima okoliša. Dešavalo se da su se jedinke iste vrste ponašale različito u istom pokusu, što može biti posljedica njihovog općeg stanja. Veću otpornost pojedinih životinjskih skupina i vrsta na određene toksikante trebalo bi stoga vjerojatno potražiti u intenzitetu njihovih metaboličkih procesa. Međutim, općenito je zapažanje, da su spojevi jako toksični i da se životinje ne uspijevaju oduprijeti svojim metaboličkim procesima ni kod najnižih letalnih koncentracija. Tanki hitinska kutikula također ne pruža veću zaštitu ovim rakovima.

#### Zaključak

Sva tri ispitivana spoja pokazala su veliku toksičnost na rakovima *Asellus aquaticus* i *Gammarus fossarum*. Najtoksičniji je bio kumen, pa akrilonitril i aceton. Slabiju toksičnost acetona uzrokuje njegova velika hlapljivost. Spojevi netopivi u vodi djeluju indirektno toksično na taj način što sprječavaju izmjenu plinova između vode i atmosfere. Njihovo direktno otrovno djelovanje je također nesumljivo, ali ga je teško precizirati. Akrilonitril koji je potpuno topiv u vodi i aceton koji je topiv u velikom postotku, djeluju direktno toksično na ispitivane vrste.

#### LITERATURA

- APHA (1967): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. — 12th Edition. Amer. Publ. Health Assoc. New York.
- Bodmer, G. (1945): Gegenwärtiger Stand der Abwasserfrage in Gaswerken. Monatsbull. Schweiz. Gas- u. Wasserfachmänner 25 (cit. H. Liebmann, 1960).
- Bach, A. (1929): Phenolschwund in Wasser. — Ges. — Ing. 52 (cit. H. Liebmann, 1960).
- Cairns, J., Messenger, D. I. and Colhoun, W. F. (1976): Invertebrate response to thermal shock following exposure to acutely sub-lethal concentration of chemicals. Arch. Hydrobiol. 77, 2, 164-175.
- Erben, R. (1978): Effects of some petrochemical products on the survival of *Dicranophorus forcipatus* O. F. Müller (Rotatoria) under laboratory conditions. Verh. Internat. Verein. Limnol. 20, 1988—1991.
- Herbert, D. W. M. (1962): The toxicity to rainbow trout of spent still liquors from the distillation of coal. Ann. Appl. Biol. 50, 755-777.
- Kawatski, J. A., Dawson, V. K. and Renvers, M. L. (1974): Effect of TEM and Bayer 73 on in vivo oxygen consumption of the aquatic midge *Chironomus tentans*. Trans. Amer. Fish. Soc. 3, 551-556.

- Kaila, K. and Saarikoski, J. (1977): Toxicity of pentachlorophenol and 2, 3, 6-trichlorophenol to the crayfish *Astacus fluviatilis* L. Environ. Pollut. **12**, 119-123.
- Leclere, E. et Devlaminck, F. (1950): Etude toxicologique de quelques substances généralement présentes dans les effluents d' usines à char. — Bull. Centre Belge des Eaux **8** (cit. H. Liebmann, 1960).
- Liebmann, H. (1960): Handbuch der Frischwasser und Abwasserbiologie Bd. 2 VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 933-943.
- Mastrović, M. i Knežević, E. (1977): Sprečavanje zagađivanja mora kod prijevoza nafte tankerima, na terminalima i u rafinerijama nafte. Pomorski zbornik, Rijeka, 489-507.
- Pawlaczyk—Szpilowa, M., Moskal, M., Werotelnik, J. (1972): The usefulness of biological tests for determining the toxicity of some chemical compounds in waters. Acta hydrobiol. **14**, 2, 115-127.
- Rye, R. P. Jr. and Louis King, E. Jr. (1976): Acute toxic effects of two lampricides to twenty — one freshwater Invertebrates. Trans. Am. Fish. Soc. **2**, 322-326.
- Schultz, W. T. and Dumont, N. J. (1977): Cytotoxicity of synthetic fuel products on *Tetrahymena pyriformis*. 1. Phenol. J. Protozool. **24**, 1, 164-172.
- Semenova, L. M. (1972): Taksičeskaje dejstvije fenola na zooplankton v sadkah. Biol. Vnutr. Vod. **15**, 21-25.

Tablica 1 Djelovanje petrokemijskih spojeva na vrstu *Asellus aquaticus*

Table 1 The effect of the petrochemical products on the species *Asellus aquaticus*

Ispitivani spojevi Examined compounds	Konzentracije u ml/l mg/l AN Concentrations in ml/l and mg/l of AN	Sati Hours			
		24	48	72	96
		postotak smrtnosti mortality in percentage			
Aceton	0,1	0	20	20	20
	0,5	0	20	30	30
	1	10	40	40	40
	1,5	10	40	50	50
	3	30	60	100	
Kumen	0,01	0	10	20	30
	0,05	20	30	50	70
	0,1	50	70	90	100
	0,5	100			
	1	100			
Akrilonitril	0,016	30	60	80	100
	0,04	60	100		
	0,064	60	90	100	



Tablica 2 Djelovanje petrokemijskih spojeva na vrstu *Gammarus fossarum*

Table 2 The effect of the petrochemical products on the species *Gammarus fossarum*

Ispitivani spojevi Examined compounds	Konzentracije u ml/l i mg/l AN Concentrations in ml/l and mg/l of AN	Sati Hours			
		24 postotak smrtnosti mortality in percentage	48	72	96
Aceton	1	0	0	0	0
	1,5	0	0	20	30
	3	0	30	50	60
	5	30	40	60	70
	10	60	100		
Kumen	0,01	20	30	30	40
	0,05	20	60	80	80
	0,1	60	100		
	0,5	100			
	1	100			
Akrilonitril	0,008	0	0	0	0
	0,012	0	0	0	0
	0,024	60	100		
	0,04	100			

THE EFFECT OF CUMENE, ACETONE AND ACRYLONITRILE ON CRABS *ACELLUS AQUATICUS* L. AND *GAMMARUS FOSSARUM* (ISOPODA, AMPHIPODA)

R. Erben and B. Beader

Zoology department, Faculty of science, University Zagreb

S u m m a r y

In this paper we tried to investigate the effect of cumene, acetone and acrylonitrile on the crabs *Acellus aquaticus* L. and *Gammarus fossarum* Koch., after 96 hours of exposure. The strongest toxicant was cumene, than acrylonitrile and acetone.

Cumene caused a 100% mortality in the concentration of 0,5 ml/l after 24 hours of exposure for both species. Acrylonitrile in concentrations of 0,04 mg/l for *A. aquaticus* and 0,024 mg/l for *G. fossarum*, killed all individuals after 48 hours of exposure. The same happened with acetone with the species *A. aquaticus* after 3 days of exposure in concentration of 3ml/l, and with species *G.*

*fossarum* in concentration of 10 ml/l after 48 hours of exposure. The toxicity of acetone is lower because of its evaporation.

In these experiments some physico-chemical characteristics of water, which could be in connection with the toxic effect of the examined compounds, were measured: temperature, pH, total hardness and the quantity of dissolved oxygen. No connection between the toxicity of investigated compounds and the measured parameters was observed. The exception was oxygen which was compensated by aeration.