

Sylwia Jarmołowicz<sup>1</sup>, Krystyna Demska-Zakęś<sup>2</sup>, Zdzisław Zakęś<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

<sup>2</sup>Katedra Ichtiologii, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, UWM w Olsztynie

## Toksyczność wybranych ftalanów w granicach ich rozpuszczalności w wodzie na przykładzie sandacza europejskiego, *Sander lucioperca* (L.)

### Wstęp

Ftalan, zwane również estrami ftalanowymi, są obecnie jednymi z najbardziej rozpowszechnionych organicznych związków zmiękczających, używanych przy produkcji tworzyw sztucznych (głównie polichloru winylu, polichloru winylidenu oraz polioctanu winylu). Globalną produkcję plastifikatorów ftalanowych szacuje się obecnie na ok. 5 milionów ton w skali roku. Ponad 60% zmiękczaczy zużywanych jest przez przemysły przetwórcze Ameryki Północnej, Europy oraz Japonii (Bortel 2008). Zapotrzebowanie polskiego przemysłu na estry ftalanowe pokrywane jest z zasobów krajowych w ok. 70%, a pozostałą ich ilość importuje się z krajów Unii Europejskiej (Bortel 2008). Do najczęściej stosowanych w przemyśle zalicza się ftalany: dibutyłowy (DBP), benzyłowobutyłowy (BBP), dietyloheksyłowy (DEHP), dietyłowy (DEP) oraz di-izononyłowy (DINP) (Koch i in. 2003). Wykazano, iż toksyczne dla organizmów wodnych są estry zawierające poniżej 6 atomów węgla w łańcuchu alkilowym (Staples i in. 1997), tj. DBP i BBP (tab. 1). Oba ftalany obecne są w różnego rodzaju tworzywach sztucznych, a także w farbach i lakierach, w stabilizatorach zapachów i rozpuszczalnikach. Dodatkowo ftalan dibutyłowy stosowany jest przy produkcji kosmetyków (NTP 2000). Co ciekawe, związek ten wykorzystywany jest także w akwakulturze ryb łososiowatych jako rozpuszczalnik preparatu przeciwko zewnętrznym pasożytom (BurrIDGE i Haya 2007).

TABELA 1

Wybrane właściwości fizyczne i chemiczne ftalanu dibutyłowego (DBP) i benzyłowobutyłowego (BBP)

Właściwości	DBP*	BBP**
Stan fizyczny	oleista ciecz	oleista ciecz
Wzór sumaryczny	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>
Masa cząsteczkowa	278,35	312,35
Temperatura topnienia (°C)	-35	-40,5
Temperatura wrzenia (°C)	340	370
Rozpuszczalność w wodzie (mg dm <sup>-3</sup> )	11,2	2,7
Gęstość w 25°C (g cm <sup>-3</sup> )	1,04	1,12
Prężność pary w 25°C (mm Hg)	2,7·10 <sup>-5</sup>	6,0·10 <sup>-6</sup>
Log K <sub>ow</sub>	4,45	4,59

\*Staples i in. (1997); \*\*CMA (1999)

Jak dotąd w Polsce praktycznie nie prowadzi się biomonitoringu ekosystemów wodnych pod kątem zawartości estrów ftalanowych. Badania tego typu prowadzone na świecie są często pobieżne i niekompletne, stąd też nadal wydaje się niejasne, w jaki sposób ftalany przenoszone są pomiędzy poszczególnymi ogniwami łańcucha pokarmowego. Doniesienia sprzed 30 lat o wysokim poziomie tych związków w osadach dennych i ciele ryb, wskazują na znaczne zanieczyszczenie wód na skutek m. in. prowadzenia przez człowieka nieracjonalnej gospodarki ściekowej (Wofford i in. 1981).

Koncentracje DBP w wodach powierzchniowych Stanów Zjednoczonych i Europy kształtują się na poziomie od 0,01 do 622,9 µg dm<sup>-3</sup> (Wypych 2004). Fatoki i Vernon (1990) badając brytyjskie rzeki w okolicach Manchesteru, w jednej z prób wyznaczyli niepokojąco wysokie stężenie DBP rzędu 1028 µg dm<sup>-3</sup>. Ftalan benzyłowobutyłowy ze względu na niższą rozpuszczalność niż DBP, w zbiornikach wodnych występuje w niższych koncentracjach. W przebadanych 31 rzekach i jeziorach amerykańskich stężenia tego ftalanu kształtowały się na poziomie od 0,2 do 2,4 µg dm<sup>-3</sup>; wyższe, w granicach 3,4-49,0 µg dm<sup>-3</sup>, oznaczono w wodach powierzchniowych na terenie Niemiec (Wypych 2004). Powyżej 75% ftalanów w wodach powierzchniowych oznaczanych jest we frakcji zawieszonej. W połączeniu z cząstkami koloidalnymi lub makromolekułami, jak na przykład kwasy humusowe czy proteiny mogą być transportowane na znaczne odległości. Matsuda i Schnitzer (1971) zaobserwowali, iż DBP występuje w wyższych stężeniach w wodach zanieczyszczonych, gdyż jego rozpuszczalność w wodzie rośnie wraz ze wzrostem koncentracji kwasów fulwinowych. Ftalany łącząc się z frakcją większych cząstek podlegają procesom sedymentacji.

Celem niniejszych badań było wyznaczenie średnich (mediana) stężeń letalnych LC50 DBP i BBP dla sandacza europejskiego, *Sander lucioperca* (L.) – gatunku cennego pod względem gospodarczym i ekologicznym (Zakęś

2009) oraz wrażliwego na substancje chemiczne (Siwicki i in. 2003, Demska-Zakęś 2005).

## Materiał i metody

W maju 2006 roku w laboratorium Katedry Ichtologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie przeprowadzono dwa testy statyczne toksyczności ftalanu dibutyloвого (doświadczenie I) i benzyłowobutylowego (doświadczenie II). Materiał eksperymentalny stanowił czteromiesięczny sandacz, pochodzący z Zakładu Hodowli Ryb Jesiotrowatych Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie. Ftalany DBP i BBP użyte w testach, o czystości odpowiednio 99,9 i 98,0% wyprodukowała firma Sigma Aldrich (Poznań, Polska). Testy toksyczności prowadzono zgodnie z Rozporządzeniem (2003) w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych.

W sześciu akwariach wypełnionych 6 dm<sup>3</sup> wody wodociągowej o temperaturze ok. 24°C umieszczono po siedem losowo wybranych osobników. W każdym zbiorniku umieszczono grzałki o mocy 230 W z termostatem (Wid Pol, Łódź, Polska) oraz filtr gąbkowy z pompą wirnikową Head 750 (Aqua Szut, Wrocław, Polska). Fotoperiod ustalono na 12L:12D. Ryby aklimowano przez 2 tygodnie. W tym czasie sandacze żywiono granulatem pstrągowym NUTRA (Trouvit, Nutreco Aquaculture, Francja), zawierającym 54% białka i 18% tłuszczu. Dno akwariów oczyszczano codziennie z niezjedzonych resztek paszy i odchodów. Na dobę przed rozpoczęciem doświadczeń zaprzestano żywienia.

Roztwory robocze stanowiły ftalany wymieszane z 99,8% etanolem (ABChem, Olsztyn, Polska). Tak przygotowane mieszaniny ftalanów wprowadzono do akwariów, zawierających 6 dm<sup>3</sup> wody wodociągowej. Uzyskano następujące końcowe stężenia nominalne ftalanów, w doświadczeniu I: 0,0 (grupa kontrolna), 2,09, 4,18, 6,28, 8,37, 10,46 mg DBP dm<sup>-3</sup>; w doświadczeniu II: 0,0 (grupa kontrolna), 0,55, 0,99, 1,54, 2,09, 2,64 mg BBP dm<sup>-3</sup>. Stężenie etanolu w grupie kontrolnej wynosiło 0,002%. Do akwariów wprowadzono sandacze (fot. 1). Początkowa długość całkowita i masa ciała ryb użytych w doświadczeniu I wynosiła odpowiednio: 6,90 (± 0,15) cm i 2,44 (± 0,22) g, w doświadczeniu II: 6,63 (± 0,11) cm i 2,60 (± 0,10) g.

Pomiary temperatury wody (za pomocą termometru rtęciowego), pH (pehametrem Combo, Hanna Instruments, USA) i nasycenie wody tlenem (tlenomierzem HI 9143, Hanna Instruments, USA) oznaczano o stałych porach, co 24 godziny. Obserwacje śmiertelności i zachowania ryb dokonywano po 2, 4, 8, 24, 48, 72 i 96 godzinach. Śnięte osobniki natychmiast usuwano z akwariów. Wartości letalne LC50 dla juwenalnego sandacza obliczono po 48



Fot. 1. Akwarium z sandaczem europejskim w doświadczeniu z ftalanem dibutylowym (grupa kontrolna).

i 96 godzinach zgodnie z opisanym przez Stefaniaka wzorem (1964). Uwzględnia on najwyższe stężenia, w których obserwuje się śmiertelność poniżej i powyżej 50% osobników, a także odsetek ryb reagujących przy danej dawce.

## Wyniki i dyskusja

Parametry fizyczne i chemiczne wody podczas trwania doświadczeń kształtowały się na zbliżonym poziomie (tab. 2). W doświadczeniu I w grupie kontrolnej nie obserwowano śmiertelności ryb. Podczas pierwszych 3 godzin testu w grupie sandaczy eksponowanych na działanie najwyższego stężenia DBP (10,46 mg dm<sup>-3</sup>), wystąpiły pierwsze śnięcia. U wszystkich osobników z tej grupy obserwowano objawy zaniepokojenia, gwałtowne i nieskoordynowane pływanie, zaburzenia oddechowe, tj. przyspieszoną pracę pokryw skrzelowych. W analizowanej grupie po 24 godzinach odnotowano 100% śmiertelność (tab. 3).

TABELA 2

Parametry fizyczne i chemiczne wody podczas 96-godzinnych testów toksyczności (średnie ± SD lub zakres)

	Temperatura (°C)	pH	Zawartość tlenu (%)
Doświadczenie I (DBP)			
0 h	24,1 ± 0,55	7,45-7,51	89,92 ± 0,57
24 h	24,0 ± 0,71	7,22-7,82	91,10 ± 0,98
48 h	24,2 ± 0,45	7,46-7,64	89,98 ± 1,55
72 h	24,0 ± 0,64	7,21-7,72	90,78 ± 1,13
96 h	24,3 ± 0,55	7,31-7,55	91,08 ± 1,44
Doświadczenie II (BBP)			
0 h	24,1 ± 0,31	7,60-7,80	89,72 ± 1,53
24 h	24,0 ± 0,23	7,76-7,84	89,10 ± 1,51
48 h	24,2 ± 0,31	7,83-7,94	89,18 ± 1,46
72 h	24,1 ± 0,13	7,79-7,93	89,82 ± 0,90
96 h	24,0 ± 0,36	7,91-7,97	89,75 ± 0,63

TABELA 3

LC<sub>50</sub> oraz stężenia letalne ftalanu dibutylowego (DBP) i benzylo-wobutylowego (BBP) wyznaczone dla sandacza europejskiego

Ester ftalanowy	Rodzaj testu	Czas trwania	Efekt końcowy	48h LC <sub>50</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )	96h LC <sub>50</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )	24h LC <sub>100</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )
DBP	statyczny	96h	śmiertelność	6,82	6,56	10,46
BBP	statyczny	96h	śmiertelność	-	-	-

Przeżywalność ryb rosła wraz ze spadkiem stężenia DBP w wodzie, także zmiany w zachowaniu charakterystyczne dla stresu chemicznego były mniej nasilone. Ostatecznie po 96 godzinach eksperymentu odnotowano śmiertelność: w grupie 8,37 mg DBP dm<sup>-3</sup> – 71%, w grupach 6,28 i 4,18 mg DBP dm<sup>-3</sup> – 43%, natomiast w grupie 2,09 mg DBP dm<sup>-3</sup> na poziomie 14%. Ostatecznie w przypadku ftalanu dibutylowego wyznaczono wartości letalne w granicach rozpuszczalności tego związku w wodzie. Po 48 godzinach LC<sub>50</sub> dla sandacza wynosi 6,82 mg dm<sup>-3</sup>, zaś po 96 godzinach – 6,56 mg dm<sup>-3</sup> (tab. 3). Najbardziej wrażliwe na działanie omawianego ftalanu okazały się okoń żółty *Perca flavescens* (Mitch.) oraz sum kanałowy *Ictalurus punctatus* (Raf.). W testach toksyczności ostrej wartości LC<sub>50</sub> wyznaczone po 96 godzinach wynoszą dla tych gatunków odpowiednio 0,35 i 0,46 mg DBP dm<sup>-3</sup> (Mayer i Ellersieck 1986). W niniejszych badaniach wykazano, iż wrażliwość sandacza na działanie DBP jest zbliżona do wrażliwości pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* (Walb.), dla którego wartość letalna LC<sub>50</sub> wyznaczona w testach 96-godzinnych wynosi 6,47 mg dm<sup>-3</sup> (Mayer i Sanders 1973). W przypadku ryb morskich DBP był najbardziej toksyczny wobec *Cyprinodon variegatus* (Lacepède), dla którego nominalna wartość powodująca 50% śmiertelność w próbie ryb wyniosła zaledwie 0,6 mg DBP dm<sup>-3</sup> (CMA 1984).

Wartości LC<sub>50</sub> wyznaczone dla BBP są zróżnicowane w zależności od gatunku. Często toksyczność BBP ujawniała się dopiero w stężeniach przekraczających jego rozpuszczalność w wodzie. W doświadczeniu II podczas 96-godzinnego testu w grupie ryb eksponowanych na działanie nawet najwyższego stężenia BBP, tj. 2,64 mg dm<sup>-3</sup> nie odnotowano śmiertelności ryb. Nie wystąpiły także obserwowane podczas doświadczenia I zmiany behawioralne. W przypadku tego związku ostatecznie nie wyznaczono LC<sub>50</sub>. Dla pstrąga tęczowego wartość LC<sub>50</sub> (96 h) kształtowała się na poziomie nieco wyższym niż rozpuszczalność BBP w wodzie, tj. 3,30 mg dm<sup>-3</sup> (Gledhill i in. 1980), zaś dla *Lepomis macrochirus* (Raf.) LC<sub>50</sub> (96 h) wynosiła 43,0 mg dm<sup>-3</sup>, czyli blisko 16-krotnie więcej niż rozpuszczalność tego związku w wodzie (Buccafusco i in. 1981). Najmniej odporny na działanie BBP okazał się *Pimephales promelas* (Raf.), średnie stężenie 0,78 mg dm<sup>-3</sup> powodowało 50% śmiertelność (Adams i in. 1995). W bada-

niach na gatunku morskim *Cyprinodon variegatus* (Lacepède) wartość LC<sub>50</sub> wahała się w granicach od 3,0 mg BBP dm<sup>-3</sup> (Gledhill i in. 1980) do nawet 440,0 mg BBP dm<sup>-3</sup> (stężenia nominalne) (Heitmüller i in. 1981).

W niniejszych badaniach wykazano, iż średniocząsteczkowy ftalan DBP jest toksyczny dla sandacza europejskiego w stężeniach bliskich swojej rozpuszczalności w wodzie. Natomiast BBP nie wykazuje takich właściwości. Ponadto sandacz jest mniej wrażliwy na działanie analizowanych ksenobiotyków w porównaniu z takimi gatunkami ryb słodkowodnych jak: okoń żółty, *Pimephales promelas* czy sum kanałowy. Uzyskane wyniki własne i dane literaturowe pozwalają na stwierdzenie, iż wrażliwość sandacza jest zbliżona do wrażliwości pstrąga tęczowego, należącego do rodziny łososiowatych. Na podstawie przeprowadzonych testów toksyczności ostrej na organizmach wodnych, oba ftalany zgodnie z regulacjami unijnymi zostały zaklasyfikowane jako substancje działające bardzo toksycznie na organizm ryb (EC 1993). Choć z reguły w wodach powierzchniowych ftalany występują w stężeniach niższych niż wartości letalne wyznaczone dla ryb, niemniej mogą stanowić realne zagrożenie dla bytujących w niej organizmów. Potencjał działania ftalanów na organizmy wodne został bardzo słabo poznany. Estrы ftalanowe należą bowiem do grupy egzogennych związków endokrynnych (*endocrine disrupters* – EDs), które zakłócają funkcjonowanie gruczołów dokrewnych i działają toksycznie na układ płciowy ssaków (Gray i in. 2000, Tyl i in. 2004). Dlatego niezwykle istotne jest prowadzenie stałego monitoringu gleby, wód oraz prób biologicznych (głównie bezkręgowców wodnych, w tym bentosowych i ryb) pod kątem obecności estrów ftalanowych.

## Literatura

- Adams W.J., Biddinger G.R., Robillard K.A., Gorsuch J.W. 1995 – A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms – *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1569-1574.
- Bortel K. 2008 – Środki pomocnicze stosowane w przetwórstwie tworzyw polimerowych. cz. 1. – *Przetwórstwo Tworzyw.* UP, Lublin: 133-137.
- Buccafusco R.J., Ells S.J., LeBlanc G.A. 1981 – Acute toxicity of priority pollutants to bluegill (*Lepomis macrochirus*) – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 446-452.
- Burridge L.E., Haya K. 2007 – A Review of di-n-butylphthalate in the aquatic environment: concerns regarding its use in salmonid aquaculture – *J. World Aquacult. Soc.* 26: 1-13.
- CMA. 1984. Chemicals Manufacturers Association – Generation of Environmental Fate and Effects Data Base on 14 Phthalate Esters – Summary Report – Environmental Studies Phase I, Phthalate Esters Program Panel, Washington, DC.
- CMA. 1999. Chemical manufacturers association – Phthalate esters panel in response to request for public input on seven phthalate esters – FR Doc. 99-9484, Washington, DC.
- Demaska-Zakęś K. 2005 – Wpływ wybranych ksenobiotyków na rozwój układu płciowego ryb – *Wyd. UWM, Olsztyn. Rozprawy i Monografie* 103: 61 s.
- EC (European Commission). 1993 – Council Regulation 793/93/EEC of March 1993 on the evaluation and control of risks of existing substances – *Official Journal of the European Communities*, L48/1.
- Fatoki O., Vernon F. 1990 – Phthalate esters in rivers of the Greater Manchester area, UK – *Sci. Total Environ.* 95: 227-232.

- Gledhill W.E., Kaley R.G., Adams W.J., Hicks O., Michael E.R., Saeger V.W., LeBlanc G.S. 1980 – An environmental safety assessment of butyl benzyl phthalate – *Environ. Sci. Technol.* 14: 301.
- Gray L.E., Ostby J., Furr J., Price M., Veeramachaneni D.N., Parks L. 2000 – Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat – *Toxicol. Sci.* 58 (2): 350-365.
- Heitmuller P.T., Hotlister T.A., Parrish P.R. 1981 – Acute toxicity of 54 industrial chemicals to sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 596.
- Koch H.M., Rossbach B., Drexler H., Angerer J. 2003 – Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates – determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine – *Environ. Res.* 93: 177-185.
- Mayer F.L., Sanders H.O. 1973 – Toxicology of phthalic acid esters in aquatic organisms – *Environ. Health Perspect.* 3: 153-157.
- Mayer F.L., Ellersieck M.R. 1986 – Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals – No. PB86-239878. Washington, DC: US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Matsuda K., Schnitzer M. 1971 – Reactions between fulvic acid, a soil humic material and dialkyl phthalates – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 200-204.
- NTP. 2000 – National Toxicology Program. NTP-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction on di-n-butyl phthalate (DBP) – Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, USA, 69 s.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 28 lipca 2003 roku w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizyko-chemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych (Dz. U. nr 232, poz. 2343).
- Siwicki A.K., Zakęś Z., Trapkowska S., Terech-Majewska E., Czerniak S., Głąbski E., Kaziński K. 2003 – Nonspecific cellular and humoral defence mechanisms in pikeperch (*Sander lucioperca*) grown in an intensive system of culture – *Arch. Pol. Fish.* 11: 207-212.
- Staples C.A., Peterson D.R., Parkerton T.F., Adams W.J. 1997 – The environmental fate of phthalate esters: a literature review – *Chemosphere* 35: 667-749.
- Stefaniak B., 1964 – Metody oznaczania dawek leków i trucizn (ED<sub>50</sub> i LD<sub>50</sub>) – *Med. Wet.* 20 (5): 284-291.
- Tyl R.W., Myers C.B., Marr M.C., Fail P.A., Seely J.C., Brine D.R., Barter R.A., Butala J.H. 2004 – Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats – *Reprod. Toxicol.* 18: 241-264.
- Wofford H.W., Wilsey C.D., Neff G.S., Giam C.S., Neff J.M. 1981 – Bioaccumulation and Metabolism of Phthalate Esters by Oysters, Brown Shrimp, and Sheepshead Minnows – *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5: 202-210.
- Wypych G. 2004 – Handbook of Plasticizers – ChemTec Publishing, Ontario, Canada, 687 s.
- Zakęś Z. 2009 – Sandacz. Chów i hodowla. Poradnik hodowcy – Wyd. IRS, Olsztyn, 203 s.

Przyjęto po recenzji 29.10.2010 r.

## TOXICITY IN EUROPEAN PIKEPERCH, *SANDER LUCIOPERCA* (L.) OF SELECTED PHTHALATES AT THE LIMIT OF THEIR SOLUBILITY IN WATER

Sylwia Jarmołowicz, Krystyna Demska-Zakęś, Zdzisław Zakęś

**ABSTRACT.** The aim of the present study was to determine lethal concentrations LC<sub>50</sub> of dibutyl phthalate (DBP) and benzyl butyl phthalate (BBP) for European pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). The tests were conducted in a static system, using the following nominal concentrations of phthalates: 0.0; 2.09; 4.18; 6.28; 8.37; 10.46 mg DBP dm<sup>-3</sup> and 0.0; 0.55; 0.99; 1.54; 2.09; 2.64 mg BBP dm<sup>-3</sup>. The mean lethal concentration of DBP estimated in a 96-hour acute test (96h LC<sub>50</sub>) was 6.56 mg dm<sup>-3</sup>. However, BBP at its aqueous solubility limit of 2.64 mg dm<sup>-3</sup> did not have a negative impact on the fish. Pikeperch was more tolerant of both phthalates in comparison to yellow perch, *Perca flavescens* (Mitch.), fathead minnow, *Pimephales promelas* (Raf.), or channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Raf.). The sensitivity of pikeperch to phthalates is similar to that of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walb.).

**Keywords:** dibutyl phthalate, benzyl butyl phthalate, acute toxicity, European pikeperch