

Marlena Piontek *

OCENA STOPNIA TOKSYCZNOŚCI WYBRANYCH ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH NA PODSTAWIE TESTÓW Z *DAPHNIA MAGNA STRAUS*.

Streszczenie

*Skorupiak planktonowy rozwielitka *Daphnia magna* Straus jest organizmem często używanym do badań toksykologicznych. Różne warunki towarzyszące testom (woda, temperatura, zmienna kondycja populacji) utrudniają porównanie opublikowanych rezultatów. W pracy przedstawiono wyniki badań 28 substancji chemicznych organicznych i nieorganicznych. Testy wykonano w warunkach umożliwiających powtarzalność badań: preparowana woda do rozcieńczeń, sprawdzający test kondycyjny, użycie osobników 3 dniowych i stałe warunki laboratoryjne. Zastosowana metoda stwarza możliwość wykonania badań w różnym czasie i porównania wyników, co stanowi podstawową wartość pracy.*

1. WSTĘP

Rozwielitka duża jest organizmem powszechnie stosowanym w badaniach toksykologicznych [14. Solski 1968, 15. Solski 1977, 16. Solski 1983]. Badania te były prowadzone w różnych warunkach (skład chemiczny wody, temperatura i inne) z populacją o nieznannej kondycji, stąd uzyskane wyniki przez badaczy są najczęściej nieporównywalne.

W niniejszej pracy używano do doświadczeń wody standardowej [7. ISO document, 1980], wiek rozwielitek wynosił 3 dni, ich stan fizjologiczny określano testem z $K_2Cr_2O_7$ [9. INTERNATIONAL Standard, 1984]. Przyjęty sposób hodowli rozwielitek i metody wykonania doświadczeń stwarzają możliwości porównywania i interpretacji wyników badań,

* Marlena PIONTEK – Zakład Odnowy Środowiska, Politechnika Zielonogórska

przeprowadzonych w różnym czasie, z populacją różniącą się, co do stanu fizjologicznego (kondycji).

Przyjętą metodykę sprawdzono na stosunkowo bogatym materiale : 12 soli mineralnych i 16 substancji pochodzenia organicznego.

2. MATERIAŁ

Daphnia magna (rozwielitka duża) jest pospolitym organizmem planktonowym wód stojących. Żyje zarówno w drobnych zbiornikach nawet okresowych, jak i większych. Należy do zwierząt rozdzielno-płciowych. W komorze lęgowej samic przebywają jaja i świeżo wylęгле młode. Rozwój jest prosty, a jego czas krótki (wynosi około 5 dni) w temp. $20^{\circ}C$ [18. Stańczykowska 1979]. U wioślarek występuje heterogonia. Jest to zjawisko polegające na występowaniu na przemian pokoleń rozwijających się partenogenetycznie i dwupłciowo. W okresie sprzyjających warunków zewnętrznych rozmnażanie partenogenetyczne pozwala na szybki rozwój i przez wielokrotny rozród prowadzi do wydatnego zwiększenia populacji [13. Praca zbiorowa, 1973].

Rozwielitka duża jest organizmem powszechnie stosowanym w badaniach toksykologicznych [14. Solski 1968, 15. Solski 1977, 16. Solski 1983]. Używane do doświadczeń rozwielitki pochodziły z własnej hodowli. Prowadzono ją w akwariach o pojemności 10 l, w temperaturze pokojowej $18-22^{\circ}C$, stosując oświetlenie jarzeniowe o natężeniu 4000 luksów z zachowaniem rytmu dobowego dnia i nocy [15. Solski 1977]. Pokarm stanowiły drożdże piekarnicze oraz glony: *Scenedesmus* i *Chlorella* [15 Solski 1977, 18. Stańczykowska 1979]. Glony hodowano w kolbach o pojemności 400ml na pożywce mineralnej wg Jankowskiego [10. Jankowski, 1964].

Rozwielitki poddano działaniu trucizn z grupy związków mineralnych i organicznych:

Związki organiczne

1. fenol
2. hydrochinon
3. pirogalol
4. pirokatechina
5. p-nitrofenol
6. o-krezol
7. m-krezol
8. p-krezol
9. o-toluidyna
10. p-toluoidyna
11. formaldehyd
12. kwas octowy
13. octan ołowiowy
14. szczawian amonowy
15. metanol
16. glikol etylenowy

Związki nieorganiczne

1. chlorek rtęciowy
2. chlorek kadmowy
3. siarczan miedziowy
4. siarczan cynkowy
5. azotan kobaltowy
6. fluorek potasowy
7. azotan barowy
8. azotan sodowy
9. cyjanek potasowy
10. rodanek potasowy
11. żelazicyjanek potasowy
12. nitroprusydek sodowy

Rozwielitki użyte do badań były w wieku 3 dni, ich wielkość mieściła się w granicach 1.0-1.5 mm. Stan fizjologiczny (kondycję) organizmów testowych w okresie prowadzonych badań określano na podstawie testów kontrolnych z dwuchromianem potasu [9. INTERNATIONAL Standard, 1984]. Ze względu na częste wykonywanie testów kontrolnych ilość organizmów w doświadczeniu $K_2Cr_2O_7$ zmniejszono, ograniczając się do jednego lub dwóch powtórzeń.

3. METODY

Sposób eksperymentowania

Sporządzanie stężeń trucizn

Do rozcieńczeń badanych substancji stosowano wodę standardową, sporządzaną wg przepisu ISO [7. ISO document, 1980]. W tym celu przygotowano trzy roztwory podstawowe:

1 - 320g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ + 29g $NaCl$ + 9g $NaNO_3$ rozpuszczono w wodzie redestylowanej do objętości 1 litra;

2 - 151g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 79g Na_2SO_4 rozpuszczano w wodzie redetylowanej do objętości 1 litra;

3 - 27g $NaHCO_3$ rozpuszczano w wodzie redetylowanej do objętości 1 litra.

Do sporządzenia 10 litrów wody standardowej, prócz wody redetylowanej używano po 5 ml roztworów podstawowych 1 i 2 oraz 50ml roztworu podstawowego 3. Tak przygotowaną wodę napowietrzano przez około 24 godziny celem ustabilizowania odczynu do wartości 7.8 ± 0.2 pH (w przypadku większych odchyień pH dodawano po parę kropli roztworu HCL lub NaOH).

Skład jonowy tej wody wyrażony w ppm przedstawia się następująco:

wapń 29.5	chlorki 60.5
magnez 7.5	siarczany 56.0
sód 56.5	azotany 3.5
węglany 100.0	

Twardość tej wody wynosi 100 ppm (wyrażona w postaci $CaCO_3$).

Stężenia robocze badanych substancji sporządzano stosując dzielniki od 1.8 do 1.05. Uzyskany szereg geometryczny rozcieńczeń zawierał co najmniej 10 stężeń, w tym 5-7 stężeń powodujących śmierć organizmów testowych w granicach od powyżej 0 do poniżej 100% [15. Solski, 1977]. W przypadku substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie i użyciu etanolu stężonego do ich rozpuszczenia, przestrzegano zasady, że ilość etanolu nie przekracza 0.05% [5. ISO document, 1979].

Wytrącaniu się soli metali ciężkich w sporządzanych roztworach wodnych zapobiegano, wprowadzając wersenian dwusodowy zgodnie z równaniami stechiometrycznymi [21. Welcher 1963]. Ilości użytego wersenianu dwusodowego w roztworach roboczych były znacznie niższe od stężenia granicznego tego związku dla *Dugesia tigrina* i *Daphnia magna*.

Zapotrzebowanie na organizmy testowe o wyrównanym stanie fizjologicznym dla przeprowadzenia jednego doświadczenia jest następujące:

- od 11 do kilkunastu stężeń (w tym jedna próba kontrolna),
- każde stężenie przygotowywane jest w 3 powtórzeniach (po 3 naczynia),

- do każdego naczynia wprowadza się po 10 osobników, co odpowiada łącznej ilości około 400 organizmów testowych.

3.2 Naczynia i objętość roztworów

Rozwielitki umieszczono w probówkach o pojemności 45 ml napelnionych 40 ml roztworu badanej substancji. Rozwielitki wprowadzano do probówek za pomocą pipety w możliwie szybkim czasie, stąd liczba osobników w probówkach wahała się od 9 do 12. Zastosowanie probówek ułatwiało obserwację zachowania się rozwielitek oraz dokonywania zapisu porażenia i śmierci.

3.3 Interpretacja wyników badań

Wpływ toksyczny badanych trucizn na rozwielitki oceniano na podstawie zapisu porażenia i śmierci w doświadczeniu trwającym 48 godzin [15. Solski, 1977]. Stopień toksyczności w doświadczeniu wyrażano stężeniem granicznym (GC) oraz LC 10/48 i LC 50/48.

W badaniach toksykologicznych wyróżniono dwa rodzaje stężeń: subletalne i letalne.

Stężenia subletalne

W kategorii stężeń subletalnych, przyjmując za podstawę oceny toksycznego oddziaływania trucizn objawy, wskazujące na inhibicję procesów życiowych u organizmów testowych np. słabsza reakcja na bodźce zewnętrzne, utrata równowagi (*Daphnia magna*) oraz zahamowanie procesu regeneracji (*Dugesia tigrina*), wyróżniono GC (stężenie graniczne) i EC 50.

GC (stężenie graniczne) - jest to najwyższe stężenie badanej substancji, w którym po określonym czasie nie stwierdza się żadnych ujemnych zmian u organizmów testowych [1. Autorenkollektiv, 1970, 15. Solski 1977].

EC 50 - jest to stężenie trucizny, które po określonym czasie (w porównaniu z próbą kontrolną) powoduje określony ujemny skutek u 50% badanych organizmów [6. ISO document, 1979].

Stężenia letalne

W kategorii stężeń letalnych, przyjmując za podstawę toksycznego wpływu trucizn na organizmy testowe ich śmierć, wyróżniono LC 10 i LC 50.

LC 10¹ - jest to stężenie badanej substancji, które po określonym czasie powoduje śmierć 10% organizmów testowych [19. Tscheu, 1983].

LC 50 - jest to stężenie, które po określonym czasie powoduje śmierć 50% organizmów testowych [1. Autorenkollektiv 1970,25. ISO document 1984,15. Solski 1977,17. SEV 1983].

Analiza statystyczna

Przebieg porażenia lub śmierci organizmów testowych pod wpływem trucizny można przedstawić graficznie. Odkładając na osi odciętych stężenia, a na osi rzędnych procenty śmiertelności lub porażenia, otrzymuje się krzywą regresji o kształcie sigmoidalnym. Krzywą sigmoidalną przekształca się w linię prostą, przyjmując na osi poziomej skalę logarytmiczną stężeń, zaś na osi pionowej (wyrażającej reakcję zwierząt w procentach) skalę probitową [3. Bliss 1934,4. Finney 1978, 12. Litchfield 1949].

Z wykreślonych prostych odczytuje się wartości EC 50, LC 10 i LC 50.

Analizę statystyczną wyników badań nad wpływem substancji trujących na porażenie lub śmierć D. magna przeprowadzono metodą graficzną opisaną przez Weber [20. Weber, 1972]. Analiza statystyczna wyników przeprowadzonych doświadczeń zawiera:

1. równanie prostej $y = a + bx$ wyznaczone na podstawie badań empirycznych,
2. współczynnik regresji z odchyleniem standardowym,
3. przedziały ufności dla EC 50 i LC 50,
4. test zgodności rozkładu doświadczalnego z rozkładem normalnym.

Równanie prostej $y = a + bx$ wyznaczone przy użyciu interpolacji metodą najmniejszych kwadratów [4. Finney, 1978]. Oznacza to, że otrzymane równanie minimalizuje sumę kwadratów z różnic między wartościami

¹ są propozycje by w przypadku testów prowadzonych przy użyciu organizmów zwierzęcych przyjąć LC 10 za stężenie progowe [2. Autorenkollektiv 1982, 19. Tscheu 1983].

empirycznymi a wartościami prostej dla określonych wartości argumentów. Przedziały ufności określono na podstawie rozkładu t (Studenta - Fishera) uwzględniającego różnicę dzielącą rozkład prawdopodobieństwa dla nieskończonej liczby próbek. We wszystkich obliczeniach przyjęto współczynnik ufności równy 0.95 [20. Weber, 1972].

Wyniki otrzymane ze wszystkich doświadczeń poddano testowi zgodności rozkładu doświadczalnego z rozkładem normalnym. W obliczeniach wykorzystano test χ^2 oparty na kryterium Pearsona [20. Weber, 1972].

Badane rozkłady uznano za wystarczająco zbliżone z rozkładem normalnym, jeżeli prawdopodobieństwo wyznaczone w teście χ^2 było większe od 0.7 [14. Solski 1968, 20. Weber 1972]. Wszystkie punkty analizy statystycznej wykorzystują stabilizowane wartości funkcji i argumentów. W tym celu w obliczeniach z wartościami dyskretnymi stosowano interpolację liniową, zakładając liniowy charakter zmian funkcji i argumentów w przedziałach między kolejnymi wartościami.

W obliczeniach wykorzystano maszynę cyfrową SM 4, dla której program został napisany w języku FORTRAN w oparciu o metody statystyczne dla biologów [4. Finney 1978, 20. Weber 1972].

TABELA 1

Wrażliwość Daphnia magna Straus na $K_2Cr_2O_7$ w zależności od wieku.

L.p.	wiek dni	stężenie graniczne mg/l	EC 50/48 mg/l	LC 10/48 mg/l	LC 50/48 mg/l
1	1	0.11	0.20	0.16	0.26
2	3	0.16	0.33	0.23	0.36
3	3	0.16	0.29	0.24	0.33
4	3	0.19	0.28	0.22	0.35
5	3	0.13	0.33	0.24	0.37
6	3	0.16	0.34	0.23	0.36
7	3	0.19	0.30	0.26	0.37
8	3	0.19	0.31	0.24	0.35
9	>10	0.16	0.35	0.25	0.41

4. WYNIKI BADAŃ

4.1. Test z dwuchromianem potasu

Wpływ toksyczny $K_2Cr_2O_7$ na *D.magna* oceniano na podstawie zapisu porażenia i śmierci po 48 godzinach, oraz wyznaczeniu stężenia granicznego, EC 50/48, LC 10/48 i LC 50/48 (Tab. 1.). Dynamikę trucia rozwielitek przez $K_2Cr_2O_7$ wyrażają wielkości współczynników regresji.

Wyniki badań przeprowadzonych z rozwielitkami w wieku 1, 3 i powyżej 10 dni zestawiono w Tab. 1. Najwrażliwszą na dwuchromian potasu okazała się populacja jednodniowa - LC 50/48 wynosiło $0.26 \text{ mg} / \text{dm}^3$. Wyznaczone dla 7 grup populacyjnych w wieku 3 dni LC 50/48 mieściło się w granicach $0.33\text{-}0.37 \text{ mg} / \text{dm}^3$ $K_2Cr_2O_7$.

Uzyskane wartości LC 50/48 dla dwuchromianu potasu w badaniach z rozwielitkami w wieku 3 dni, wskazują na bardzo wyrównaną kondycję użytych do doświadczeń populacji. Rozwielitki w wieku ponad 10 dni (zawierały w komorach łęgowych jaja i świeżo wylęglę młode) okazały się odporniejsze na $K_2Cr_2O_7$ od populacji w wieku 3 dni, LC 50/48 wynosiło $0.41 \text{ mg} / \text{dm}^3$. Wylęglę, młode rozwielitki podczas trwania doświadczeń nie ginęły, co mogłoby wskazywać na pojawienie się odporności nabytej [11. Le Blanc, 1982].

4.2 Wpływ toksyczny wybranych substancji mineralnych i organicznych

Wpływ toksyczny 28 substancji chemicznych na rozwielitki oceniano na podstawie zapisu porażen i śmierci oraz wyznaczeniu stężeń granicznych, LC 10/48 i LC 50/48, co przedstawia Tab. 2.

Dynamikę trucia rozwielitek przez te substancje wyrażają wielkości współczynników regresji.

Najbardziej trującymi substancjami dla *D.magna* były sole metali ciężkich: chlorek rtęci (LC 50/48 = $0.007 \text{ mg} / \text{dm}^3$), siarczan miedzi (LC 50/48 = $0.04 \text{ mg} / \text{dm}^3$) i chlorek kadmu (LC 50/48 = $0.06 \text{ mg} / \text{dm}^3$).

TABELA 2

Wpływ toksyczny wybranych trucizn na Daphnia magna Straus.

L. p.	substancja	stężenie	LC 10/48	LC 50/48
		graniczne		
		mg/l	mg/l	mg/l
1	chlerek rtęciowy	0.002	0.003	0.007
2	siarczan miedziowy	0.01	0.02	0.04
3	chlerek kadmowy	0.01	0.02	0.06
4	siarczan cynkowy	0.9	1.0	2.4
5	azotan kobaltowy	2.5	4.5	8.4
6	fluorek potasowy	292.3	318.8	387.4
7	azotan barowy	82.1	94.3	123.0
8	azotyn sodowy	65.4	84.5	118.8
9	cyjanek potasowy	0.6	0.9	2.0
10	rodanek potasowy	4.7	6.2	17.1
11	żelazicyjanek potasowy	2.6	4.9	20.6
12	nitroprusydek sodowy	154.2	174.9	243.8
13	fenol	1.5	2.7	14.5
14	hydrochinon	0.06	0.09	0.18
15	pirogalol	2.4	2.9	6.1
16	pirokatechina	0.4	0.6	2.1
17	p-nitrofenol	0.5	0.9	2.6
18	o-krezol	4.8	6.6	12.8
19	m-krezol	6.7	9.4	18.5
20	p-krezol	1.5	3.5	9.9
21	o-toluidyna	0.4	1.1	4.3
22	p-toluidyna	0.05	0.28	2.8
23	formaldehyd	0.7	1.0	3.7
24	kwasy octowy	34.0	35.6	55.9
25	octan ołowiu	1.7	3.5	7.2
26	szczałian amonowy	42.4	45.9	65.1
27	metanol	$14.0 \cdot 10^3$	$18.5 \cdot 10^3$	$25.1 \cdot 10^3$
28	glikol etylenowy	$14.0 \cdot 10^3$	$16.3 \cdot 10^3$	$21.5 \cdot 10^3$

Ponadto wysoce toksyczny dla rozwielitek okazał się hydrochinon (LC 50/48 = 0.18 mg / dm³). Nieco mniejszą szkodliwość wykazały: cyjanek potasu, pirokatechina, siarczan cynku, p-nitrofenol, p-toluidyna i formaldehyd (wartości LC 50/48 wahały się od 2.0 mg / dm³ do 3.7 mg / dm³).

Substancjami bardzo mało trującymi okazały się alkohole: glikol etylenowy (LC 50/48 = 22 g / dm³) i metanol (LC 50/48 = 25 g / dm³) (Tab. 2.).

LITERATURA

- [1] Autorenkollektiv, *Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung. Bd II.* 1. Aufl., Lieferung 1-3. 1970-1975 VEB G. Fischer Verlag, Jena. 1970.
- [2] Autorenkollektiv, *Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung. Band 2.* VEB G. Fischer Verlag, Jena. 1982.
- [3] **BLISS C.J.:** *The method of probitis.* Science, 79, 38 i 409, 1934.
- [4] **FINNEY D.J.:** *Statistical methods in biological assay.* Griffin Ltd. Wycombe, United Kingdom, 1978.
- [5] **ISO** document. *Second proposal for a standard method for screening chemicals and products for acute toxicity to freshwater fish using a semistatic procedure.* ISO/TC 147/S.C. 5/WG 3 N 28. 1979.
- [6] **ISO** document. *Determination of acute toxicity with *Poecilia reticulata*.* ISO/TC 147/S.C. 5/WG 3 N 33, 1979.
- [7] **ISO** document. *Determination of acute lethal toxicity of substances to freshwater fish using a semi - static procedure.* ISO/TC 147/S.C. 5/GT 3 N 38. 1980.
- [8] **ISO** document. *Draft international standard. Water quality - Vocabulary, Part 3.* ISO/DIS 6107/3.2. 1984
- [9] **INTERNATIONAL** Standard, Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (Brachydanio

- erio Hamilton - Buchanan, Teleostei, Cyprinidae) - Part I: Static method. ISO 7346/1. - 1984 (E)
- [10] **JANKOWSKI A.:** *Badania nad selekcją glonów dla potrzeb kultur masowych.* Inst. Zootechn., 1076, 1964.
- [11] **LE BLANC C.A.:** *Laboratory investigation into the development of resistance of Daphnia magna (Straus) to environmental pollutants.* Pollut.A, 27 (4), 309-322. 1982.
- [12] **LITCHFIELD J.T., F. WILCOXON,:** *A simplified method of evaluating dose effect experiments.* J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113. 1949
- [13] Praca zbiorowa pod red. E. Grabdy: Zoologia. T.II, *Bezkęgowce.* PWN, Warszawa. 1973.
- [14] **SOLSKI A.:** *Ocena herbicydów dla celów rybackich.* Opol. Tow. Przyjaciół Nauk. Zesz. Przyrodn., 8, 61-125. 1968.
- [15] **SOLSKI A.:** *Metodyka badań biotoksykologicznych.* Inst. Meteorol. i Gosp. Wodnej (maszynopis), Wrocław. 1977.
- [16] **SOLSKI A.:** *Ocena stopnia toksyczności trucizn w badaniach modelowych ekosystemu wodnego,* (w:) Bioindykacja skażeń przemysłowych i rolniczych. PAN Oddział we Wrocławiu, 237-249. 1983.
- [17] Soviet Ekonomiceskoj Vzaimpomosci: *Unificirovannyje metody issledovanija kacestwa vod.* C. III, Moskva. 1983.
- [18] **STAŃCZYKOWSKA A.:** *Zwierzęta bezkręgowce naszych wód.* WSiP, Warszawa. 1979.
- [19] **TSCHEU-SCHLÜTER M.:** *Zur toxixitat einfacher und komplexer Cyanide gegenüber Wasserorganismen.* Acta hydrochim. et hydrobiol., 11(2), 169-179. 1983.
- [20] **WEBER E.:** *Grundriss der biologischen Statistic.* VEB Fischer Verlag, Jena. 1972.
- [21] **WELCHER F.J.:** *Analityczne zastosowanie kwasu wersenowego.* WNT, Warszawa. 1963.