

Marlena PIONTEK*, Katarzyna BEDNAR*

STAŁA KONTROLA STANU FIZJOLOGICZNEGO BIOINDYKATORÓW W BADANIACH TOKSYKOLOGICZNYCH. TEST KONDYCYJNY

W Instytucie Inżynierii Środowiska UZ badania biotoksykologiczne prowadzone są od wielu lat. W trakcie tych badań ustalono, że brak śmiertelności organizmów testowych w próbach kontrolnych z zastosowaniem wody do rozcieńczeń nie do końca odzwierciedla stan fizjologiczny badanych organizmów. Dlatego stale przeprowadza się testy kontrolne przy użyciu tej samej substancji. Z wielu powodów wybrano dwuchromian potasu ($K_2Cr_2O_7$), [6,7,8].

Zakład Ekologii Stosowanej UZ wykonuje biotesty, w tym testy kondycyjne przy użyciu pięciu organizmów: *Dugesia tigrina* Girard, *Daphnia magna* Strauss, *Tubifex tubifex* Lamarck, larwy *Chironomidae* sp. oraz rośliny naczyniowej, rzęsy drobnej *Lemna minor* (L.). W przeprowadzonych badaniach [6] ustalono, że 96-h LC 50 dla *Dugesia tigrina* Girard powinno wynosić $22.5 \pm 2.5 \text{ mg dm}^{-3} K_2Cr_2O_7$, a dla rozwielitki *Daphnia magna* Strauss 48-h LC 50 mieści się w granicach $0.33\text{--}0.37 \text{ mg dm}^{-3} K_2Cr_2O_7$. Badania te dowiodły zasadność wykonywania testów kondycyjnych do każdej serii badań przy użyciu tej samej substancji chemicznej. Stosowanie testu kondycyjnego gwarantuje powtarzalność wyników w badaniach toksykologicznych niezależnie od terminu prowadzenia badań i użytych trucizn.

1. WPROWADZENIE

Organizmy używane jako bioindykatory w badaniach toksykologicznych mogą wykazywać różną odporność na trucizny. Różnice w odporności poszczególnych gatunków mogą być bardzo duże [11]. Wpływ związków trujących na organizm jest zależny od właściwości fizykochemicznych samego związku, użytego bioindykatora i wielu innych czynników [4]. Działanie związków toksycznych może objawiać się w różnorodny sposób. Może ono być:

- krótkie i zabójcze,
- trwające dłuższy czas zanim wywoła śmierć zwierząt lub roślin,

* Instytut Inżynierii Środowiska, ul. Szafrana 15, 65-516 Zielona Góra, tel.068 328 26 37,
e-mail: M.Piontek@iis.uz.zgora.pl, K.Bednar@iis.uz.zgora.pl

- ukryte, które powoduje stopniowe pogorszenie się stanu zdrowotnego organizmu wskutek ciągłych zakłóceń procesów fizjologicznych (charakter chroniczny), [11].

Każdy żywy organizm przeprowadza dużą liczbę procesów biochemicznych, dlatego trujące działanie związków chemicznych zaburzających te procesy odznacza się ogromną różnorodnością. Mechanizm działania poszczególnych trucizn jest skomplikowany. W jego przebiegu występuje także synergizm i antagonizm samych trucizn. Należy go rozpatrywać przy uwzględnieniu wielu czynników wywierających istotny wpływ na powstający ostateczny obraz zatrucia. Wynik określony jest wypadkową działania wielu czynników, z których nie wszystkie są nam znane [5].

Jednym z ważnych czynników wpływających na śmiertelność organizmów testowych jest ich kondycja, która zależy od: tempa rozmnażania, pożywienia, pory roku, temperatury, od wieku organizmów używanych do badań, a także stosowanej do rozcieńczeń wody (parametry fizyko-chemiczne). W pracy przedstawione są wyniki testów, które nazywamy testami kondycyjnymi. Potwierdzają one wcześniejsze rozważania. Żeby otrzymywać wiarygodne wyniki w badaniach toksykologicznych trzeba przestrzegać zasad eksperymentowania, a materiał biologiczny kontrolować.

2. MATERIAŁY I METODY

W badaniach biotoksykologicznych zastosowano pięć organizmów: *Dugesia tigrina* Girard, *Daphnia magna* Strauss, *Tubifex tubifex* Lamarck, larwy *Chironomidae* sp. oraz roślinę naczyniową, rzęśę drobną *Lemna minor* (L.). Organizmy testowe używane do badań za wyjątkiem *Tubifex tubifex* oraz larw *Chironomidae* sp. pochodziły z hodowli laboratorium IIS.

Hodowle *Dugesia tigrina* Girard prowadzono w sposób opracowany przez Piontek [3,6]. Wypławki hodowano w zlewkach o pojemności 500 cm³ przykrytych szkiełkami zegarkowymi. Temperatura wody wahała się od 18 do 22°C. Odczyn wody utrzymywał się w granicach 7.2–8.2 pH.

Hodowle *Daphnia magna* Strauss oraz rzęsy drobnej *Lemna minor* (L.) prowadzono w akwariach o pojemności 10 dm³ w temperaturze od 18 do 22°C przy oświetleniu jarzeniowym 4000 lx, z zachowaniem rytmu dobowego dnia i nocy. Skorupiaki karmione były glonami z rodzajów *Scenedesmus* i *Chlorella* oraz suszonymi drożdżami piekarniczymi.

Do przeprowadzenia testów kontrolnych wybrano substancję chemiczną - dwuchromian potasu (K₂Cr₂O₇). Jest to związek nieorganiczny dobrze rozpuszczalny w wodzie, krystaliczny [1]. Stosuje się go do mianowania innych roztworów. Miano roztworów K₂Cr₂O₇ nie zmienia się przy przechowywaniu [10].

Toksyczność dwuchromianu potasu wyrażono w postaci LC 50 i EC 50. Dla *Daphnia magna* Strauss przyjęto śmiertelność organizmów po 48 godzinach trwania testu, dla *Dugesia tigrina* Girard po 96 godzinach dla *Chironomidae* sp. i *Tubifex*

tubifex Lamarc po 72 godzinach, natomiast dla rzęsy *Lemna minor* test kondycyjny trwał 240 godzin. Wyniki LC 50 oraz EC 50 dla poszczególnych organizmów zestawiono w tabeli 1. Do obliczeń wartości stężeń LC 50 i EC 50 zastosowano metodę interpretacji graficznej (analiza probitowa). Otrzymane ze wszystkich doświadczeń wyniki poddano testowi zgodności rozkładu doświadczalnego z rozkładem normalnym. W obliczeniach wykorzystano test χ^2 . Badane rozkłady uznano za wystarczająco zbliżone z rozkładem normalnym, jeżeli prawdopodobieństwo w teście χ^2 było większe od 0,7 [12].

3. WYNIKI

Poniższa tabela zawiera zestawienie wyników wartości LC 50 i EC 50 dla dwuchromianu potasu i zastosowanych organizmów testowych, bioindykatorów.

Tab. 1. Zestawienie wyników badań dla substancji $K_2Cr_2O_7$

Lp.	<i>Daphnia magna</i> 48h LC 50 mg dm ⁻³	<i>Dugesia tigrina</i> 96 h LC 50 mg dm ⁻³	<i>Chironomidae sp.</i> 72 h LC 50 mg dm ⁻³	<i>Tubifex tubifex</i> 72 h LC 50 mg dm ⁻³	<i>Lemna minor</i> 240 h EC 50 mg dm ⁻³
1.	0.24	18.6	131.8	12.0	25.1
2.	0.27	19.5	156.1	24.6	26.9
3.	0.28	20.2	178.8	28.9	30.5
4.	0.29	21.5	208.9	30.1	31.6
5.	0.32	22.1	213.7	30.3	32.5
6.	0.33	22.5	276.7	35.7	35.8
7.	0.36	23.1	302.0	37.9	36.9
8.	0.39	23.8	324.1	43.6	37.0
9.	0.51	24.6	378.7	56.9	41.5
10.	0.63	25.1	423.6	57.1	42.2
11.	1.26	27.5	457.1	61.7	45.9
12.	1.83	30.2	524.8	62.8	50.7

Uzyskane wyniki wykazały, że najczulszym na $K_2Cr_2O_7$ organizmem testowym jest rozwielitka *Daphnia magna* Strauss. Według klasyfikacji Liebmana [1962] stężenie substancji poniżej 1 mg dm⁻³ $K_2Cr_2O_7$ (tabela 2) świadczy o I klasie toksyczności - substancja wysoko trująca. Dla *Dugesia tigrina*, *Tubifex tubifex* i *Lemna minor* wyniki mieszczą się w III klasie toksyczności, natomiast dla larw *Chironomidae sp.* jest to IV klasa, słabo trująca.

Tab. 2. Stopnie toksyczności trucizn wg Liebmana [2]

Stężenie substancji	Stopnie toksyczności	Klasa
< 1 mg dm ⁻³	wysoko trująca	I
1 – 10 mg dm ⁻³	mocno trująca	II
10 – 100 mg dm ⁻³	średnio trująca	III
100 – 1000 mg dm ⁻³	słabo trująca	IV
> 1 g dm ⁻³	ledwie trująca	V

Test z *Daphnia magna* Strauss

Do badań używano najczęściej rozwielitki w wieku trzech dni. Wielkość organizmów mieściła się w granicach 1,0-1,5 mm. Test z dwuchromianem potasu wykazał rozpiętość wyników 48-h LC 50 w granicach 0.24–1.83 mg dm⁻³. Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Piontek (1996) wykazały, że na śmiertelność organizmów ma wpływ wiek bioindykatorów. Najwrażliwsze okazały się organizmy jednodniowe 48-LC 50 wyniosło 0.26 mg dm⁻³, natomiast dla organizmów w wieku 3 dni LC 50 mieściło się w granicach 0.33-0.37 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇. Najbardziej wytrzymałe okazały się organizmy w wieku ponad 10 dni. Dla nich 48-LC 50 wynosiło 0.41 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇. Wyniki 1.26 mg dm⁻³ oraz 1.83 mg dm⁻³ należy powtórzyć. Rozpiętość uzyskanych wyników wynika z użycia organizmów testowych w różnym wieku.

Test z *Dugesia tigrina* Girard

Wyplawki użyte do badań posiadały długość 12 mm i wiek około 20 dni. Doświadczenia na wyplawkach prowadzono na osobnikach całych. Toksyczność dwuchromianu potasu wyrażono w postaci 96-h LC 50. Wartości 96-h LC 50 mieściły się w przedziale 18.6–30.2 mg dm⁻³. Wcześniejsze badania wykazały, że 96-h LC 50 dla *Dugesia tigrina* Girard powinno wynosić 22.5±2.5 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇. Uzyskane wyniki zbliżone są do wcześniej przyjętych przedziałów LC 50, co świadczy o dobrej kondycji badanych organizmów i 67% prawidłowo wykonanych biotestach.

Test z *Chironomidae* sp. oraz z *Tubifex tubifex* Lamarck

Larwy *Chironomidae* sp. (ochotki) i *Tubifex tubifex* Lamarck użyte do testów kondycyjnych z dwuchromianem potasu to organizmy pochodzące ze sklepu zoologicznego. Wyniki 72-h LC 50 dla *Chironomidae* sp. mieściły się w przedziale 131.8–524.8 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇, natomiast dla *Tubifex tubifex* jest to przedział 12.0–62.8 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇. Duża rozpiętość uzyskanych wyników 72-h LC 50 świadczy o słabej kondycji organizmów, które nie pochodzą z hodowli laboratoryjnych. Organizmy te nie są wyrównane pod względem wieku, są przechowywane przez pewien okres czasu, co wpływa znacząco na ich stan fizjologiczny. Wyniki te potwierdzają konieczność używania do testów toksykologicznych organizmów

pochodzących z hodowli laboratoryjnych wyrównanych pod względem wieku i kondycji.

Test z *Lemna minor* (L.)

Test z rzęsą drobną trwał 240 godzin. Uzyskane EC 50 mieściło się w granicach 25.1–50.7 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇. Wcześniejsze badania wykazały, że zakres EC 50 dla tego organizmu testowego wynosi 35.0 ± 5,0 mg dm⁻³ K₂Cr₂O₇. Rozpiętość uzyskanych wyników testu kondycyjnego zależy m.in. od wielkości rzęsy. Wielkość tych organizmów zależy natomiast od ilości substancji biogenych zawartych w wodzie hodowlanej, a tym samym od tempa rozmnażania się rzęsy. Duża ilość biogenów powoduje szybki przyrost organizmów i zmniejsza przestrzeń gdzie organizmy mogą się rozwijać. W ten sposób otrzymuje się organizmy mniejsze. Przed testem właściwym należy rzęsę kondycjonować i namnażać w kolbach Erlenmayera, w których będą wykonywane badania.

4. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że wykonując testy biotoksykologiczne na żywych organizmach niezbędna jest stała kontrola kondycji organizmów testowych. Badania biologiczne mają subiektywny charakter. Należy pamiętać, że wykonując biotesty ma się do czynienia z żywymi organizmami różnorodnie reagującymi na te same dawki toksyn, nawet w obrębie tego samego gatunku przy osobnikach jednego wieku i ciężaru. Ponadto woda używana do prób kontrolnych jest nietoksyczna i wpływa wręcz korzystnie na organizmy testowe. Nie daje to rzeczywistego obrazu stanu fizjologicznego organizmów testowych. Wykonując testy kontrolne przy użyciu tej samej substancji trującej, w badanym przypadku dwuchromian potasu, uzyskujemy wiarygodne wyniki świadczące o tym, że dany organizm jest w dobrej kondycji i może być wykorzystany do przeprowadzenia badań toksykologicznych. Ma to głównie znaczenie w przypadku gdy laboratorium toksykologiczne nie pracuje w trybie ciągłym, a badania naukowe wykonywane są okresowo. W takim przypadku należy wszystkie organizmy doprowadzić do ustalonej wcześniejszymi wynikami kondycji. Tylko wtedy możemy uzyskać wiarygodne wyniki, a organizmy testowe mogą posłużyć do przeprowadzenia testów toksykologicznych.

LITERATURA

- [1] Bielański A. 1997. Podstawy chemii nieorganicznej. Część 3, PWN, Warszawa, 685-1033ss.
- [2] Liebmann H. 1962. *Handbuch der Frischwasser und Abwasserbiologie*. Bd. 1,2, Jena. G. Fischer Verlag 588 ss.
- [3] Piontek M. 1983/1984, The regenerative ability of the planarian *Dugesia tigrina* (Girard) and the possibility of its use in reproduction of this species. *Acta Hydrobiol.* 25/26: 81-88

- [4] Piontek M. 1996. Ocena stopnia toksyczności wybranych związków chemicznych na podstawie testów z *Daphnia magna* Straus. [Toxicity assesement of 28 mineral and organic chemical compounds on the basis of tests with *D. magna* Straus]. *Zesz. Nauk. Politechn. Zielonogórskiej*, 111, Inżynieria Środowiska 5: 49-59
- [5] Piontek M. 1996. Rozwój biologicznych metod oceny stopnia toksyczności trucizn w środowisku wodnym. *Zesz. Nauk. Politechn. Zielonogórskiej*, 111, Inżynieria Środowiska 5: 31-47
- [6] Piontek M. 1998. Application of *Dugesia tigrina* Girard in toxicological studies of aquatic environments. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 45: 565-572
- [7] Piontek M. 1999a. Use of the planarian *Dugesia tigrina* Girard in studies of acute intoxication. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 46: 41-48.
- [8] Piontek M. 1999b. Use of a planarian *Dugesia tigrina* Girard in the studies of acute toxicity of organic substacnes. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 46: 331-338.
- [9] Pionek M. 2001. Toksyczny wpływ trzech związków ołowiu na *Daphnia magna* Straus i *Dugesia tigrina* Girard. *Zesz. Nauk. Politechn. Zielonogórskiej*, 125, Inżynieria Środowiska 11: 285-292
- [10] Szmal Z.S., Lipiec T. 1997. Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 682 ss.
- [11] Turoboyski L. 1979. *Hydrobiologia techniczna*. PWN. Warszawa, 444 ss.
- [12] Weber E. 1972. *Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner*. Jena, G.Fischer Verlag 674 ss.

PERMANENT CONTROL OF TEST ORGANISM PHYSIOLOGICAL STATE IN TOXICOLOGICAL INVESTIGATIONS. CONDITION TEST

In Institute of Environmental Engineering UZ biotoxicological investigations were carried out for many years. In the course of these investigations found that the deadliness of test organism in control samples with water not the end doesn't reflect the state of physiological studied organisms. Therefore, constant control tests carried out using the same chemical compounds. With a variety of reasons, was selected potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)[6,7,8]. Department of Applied Ecology do the bioassays, including condition tests use five organisms: *Dugesia tigrina* Girard, *Daphnia magna* Strauss, *Tubifex tubifex* Lamarc, larvae *Chironomidae* sp and vascular plants, eyelashes *Lemna minor* (L). In studies [6] found that 96-h LC 50 for *Dugesia tigrina* Girard should be $22.5 \pm 2.5 \text{ mg dm}^{-3} K_2Cr_2O_7$ and for *Daphnia magna* Strauss 48-h LC 50 is within the limits of 0.33 - 0.37 $\text{mg dm}^{-3} K_2Cr_2O_7$. These studies have demonstrated the validity of the condition tests to each series of tests using the same chemical. Applying the condition test ensure repeatability of results in the toxicological tests regardless of the deadline for conducting research and used poisons.