

Introducere în metode de detectare a poluanţilor şi specii utilizate ca animale de experiment în laboratoare

Introducing of the methods of pollutants detecting and species used as experiment organisms in testing laboratories

Moşneang Crina Laura, Doma O. Alexandru, Cristina T. Romeo

Facultatea de Medicină Veterinară Timişoara

Cuvinte cheie: peşti zebură, daphnia, răme, poluare, teste

Keywords: zebrafish, daphnia, earthworms, pollution, tests

Rezumat

Peştii zebură sunt animale vertebrate utilizate adesea în cercetările asupra apelor reziduale, substanţelor chimice din mediu, medicamentelor pentru cancer şi diabet, datorită rapidităţii şi uşurinţei în manipularea şi obţinerea rezultatelor testării. Capacitatea organismelor de a detecta şi evita solurile contaminate relevă potenţialul stresor al acestor soluri şi are relevanţă ecologică datorită relaţiilor directe cu biodiversitatea solului şi calitatea acestuia ca habitat pentru organism. Teste de poluarea solului s-au realizat pe artropode (*Collembola*), răme, oligochete (*enchytraeidae*), acestea fiind teste de modificare comportamentală, putându-se observa care specii evită solurile contaminate şi dacă intensitatea răspunsului variază cu gradul de contaminare. Utilizarea *Daphnia sp.* în testare se realizează datorită sensibilităţii la o gamă largă de poluanţi acvatici cât şi datorită dimensiunilor reduse ale acestora care implică utilizarea unor cantităţi mici de substanţă de testare şi apă pentru diluţie.

Abstract

Zebrafish are vertebrate animals often used in research for wastewaters, environment chemicals, cancer and diabetes drugs due to their speed and ease for handling and obtaining test results. Organisms capacity to detect and avoid contaminated soils reveals soils stressor potential and has an ecological relevance indepted with its direct relationship to soil biodiversity and it's quality as a habitat for the organism. Soil pollution tests were accomplished on arthropods (*Collembola*), earthworms, oligochaete worms (*Enchytraeidae*), this being behavior modification tests, observing which species avoids contaminated soils and if response intensity depends on contamination degree. Using *Daphnia sp.* for testing it's possible because of their sensibility to an amount of aquatic pollutants and also for their small sizes involving a use of small volumes of test substance and water for dilution.

Testele de poluare reprezintă instrumente de detectare a poluanţilor din apă şi sol care utilizează ca indicatori de poluare vieţuitoare de mici dimensiuni facilitând realizarea experimentelor chiar şi în laboratoare care nu beneficiază de spaţii foarte mari, încurajând cercetătorii în efectuarea studiilor acute şi cronice.

1. Teste de toxicitate

1.1. Toxicitatea în mediu acvatic

1.1.1. Testele pe Păstrăvul curcubeu

a. Testul de toxicitate cu concentraţie unică de 96 h conform criteriilor evidenţiate în Metoda de Testare Biologică: Metoda de referinţă de determinare acută a letalităţii

efluenţilor asupra păstrăvului curcubeu-
Raportul EPS 1/RM/13 (2000).

Se înregistrează :

- numărul de peşti morţi în fiecare soluţie de test inclusiv în acvariile de control la 96 h;
- numărul de peşti cu modificări comportamentale atipice;
- rata mortalităţii în soluţiile de efluent şi de control, dependent de utilizarea unei singure sau mai multor concentraţii (5).

b. Testul de toxicitate LC50 pe 96 h – conform criteriilor evidenţiate în metoda de testare anterioară cât şi din Metoda de testare biologică: Testul acut de letalitate utilizând păstrăvul curcubeu - Raport EPS1/RM/9 (1990)

Condiţiile de testare sunt următoarele:

- Testul trebuie să fie static (fără înlocuirea soluțiilor pe timpul testării).

- Temperatura de testare să fie în medie de $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Adâncimea soluției în fiecare acvariu de test să fie de cel puțin 15 cm. Densitatea peștilor per acvariu să nu depășească 0.5 g/L.
- Soluțiile de testare (inclusiv controlul) vor fi oxigenate cu o rată nu mai mare de 6.5 mL/ min.
- Peștii nu vor fi hrăniți pe perioada testării;
- Testul este considerat invalid dacă mortalitatea în acvariile de control depășește 10% sau > 10% manifestă înot atipic, spasme sau pierderi ale echilibrului (3).

1.1.2. Testele pe *Daphnia magna*

a. Testul de toxicitate cu concentrație unică pe 48 h conform procedurii Metoda de referință pentru determinarea acută a letalității efluenților la *Daphnia magna* – Raport EPS 1/ RM/14 – Ediția Secundă (2000).

Rezultatele testului vor cuprinde numărul de *Daphnia sp.* moarte sau imobile în fiecare soluție de test inclusiv în control, la 48 h.

Se vor realiza observații asupra comportamentului și aspectului *Daphnia sp.* pentru fiecare soluție de testare de-a lungul întregii perioade de test [6].

b. Testul de toxicitate LC50 pe 48 h conform procedurii Metoda de testare biologică: Metoda de referință pentru determinarea acută a letalității efluenților la *Daphnia magna* - Raport EPS 1/RM/11 (1990)

Testul este invalid dacă mortalitatea în acvariile de control este > 10% sau dacă > 10% exprimă un comportament stresat (ex. imobilitate). Concentrațiile testului și numărul soluțiilor de testare se vor realiza dependent de scopul testului.

Testele de monitorizare a apelor reziduale implică uneori pregătirea unei singure

concentrații de testare (100% probă) plus controlul.

Pentru fiecare test la care se dorește evaluarea LC50 după 48 h, se vor realiza cel puțin cinci concentrații plus soluția de control.

Se vor realiza diluții seriate, în care fiecare concentrație reprezintă 50% din concentrația precedentă, constituind bazele calculării precise a LC50 și limitele de încredere de 95% (4).

c. Testul de toxicitate cronică pe *Ceriodaphnia dubia*. Este un test pe puiet de reproducere și de evidențiere a ratei de supraviețuire la toxice bazat pe protocolul Metoda de testare biologică: Test de reproducere și supraviețuire utilizând *Cladoceran Ceriodaphnia dubia* – Raport EPS1/ RM/21 (2007).

Daphnia sp. sunt microcrustacee de apă dulce care se regăsesc printre speciile capabile să convertească fitoplanctonul și bacteriile în proteine de origine animală.

Avantajele utilizării *Daphnia sp.* în testare sunt reprezentate de sensibilitatea la o gamă largă de poluanți acvatici cât și de dimensiunile reduse ale acestora care implică utilizarea unor cantități mici de substanță de testare și apă pentru diluție ducând ulterior la acumularea unor cantități acceptabile de apă reziduală, ușurând transportul și distrugerea soluțiilor de testare, reducând costurile aferente acestor manopere.

Validitatea testelor se axează pe media mortalității primei generații de *Daphnia sp.* < 20% în acvariile de control;

>60% *Daphnia sp.* din acvariile de control să producă trei generații de puiet în opt zile; o medie de > 15% tineret per femelă din acvariile de control supraviețuiește timp de trei generații; nu trebuie să fie prezentă ehippia în acvariile de control de-a lungul testului. Pentru testele la care se dorește determinarea LC50 sau ICp, trebuie realizate cel puțin șapte concentrații de testare deși este de preferat un număr ≥ 10 concentrații (7).

a. testul acut de imobilizare pe *Daphnia* sp. În testul de imobilizare acută concentrațiile substanțelor investigate exercită efecte toxice graduale asupra capacității de înot a *Daphnia* sp. În condiții de testare.

Deși perioada de testare poate fi prelungită la 48 h, anumite concentrații au un impact negativ prin reducerea mobilității *Daphnia* sp. după 24 h.

În acvariile de control, nu este permis ca mai mult de 10% *Daphnia* să fie imobilizate sau capturate la suprafața apei.

Se va evalua procentul imobilității la 24 h, respectiv 48 h în funcție de perioada de testare aleasă. În cazul în care datele obținute sunt inadecvate pentru utilizarea metodelor standard de calcul pentru EC50,

se vor alege concentrația cea mai mare care nu produce imobilizare și concentrația cea mai mică care prodece 100% imobilitate (11).

Daphtoxkit F magna

Este un kit de test care conține materiale necesare pentru șase testări de toxicitate acută pe *Daphnia magna* (Figura 1).

Organismele de test sunt incluse în kituri sub formă latentă (*ephippia*) care pot să eclozioneze în 72 h, pentru a suplimenta loturile în vederea realizării testelor de toxicitate pe *Daphnia*.

Aceste teste se realizează pe 48 h, bazându-se pe imobilitatea sau mortalitatea organismelor de testare cu calcularea EC50 sau LC50 (14).



Figura 1. Daphtoxkit F magna kit de testare microbiologică pentru *Daphnia magna* (14).

1.1.3. Testul pe plevușcă (*Pimephales promelas*)

Este un test de rezistență la toxice și creștere a larvelor de șapte zile bazat pe protocolul Metoda de testare biologică: Testul dezvoltării larvare și de supraviețuire utilizând plevuște – Raport EPS1/RM/22 (2011).

Pentru fiecare test se vor realiza minim șapte concentrații de test plus soluția de control. Dacă se înregistrează o rată a

mortalității crescută în primele două ore de la începerea testului se vor adăuga diluții suplimentare. Totuși, datorită preciziei reduse de estimare a toxicității, diluțiile 30% nu sunt recomandate (10,15).

1.1.4. Testul pe peștii Zebră

Peștii Zebră sunt adesea utilizați în sfera științifică ca animale de experiment datorită aplicabilității variate a substanțelor nocive și a timpului scurt de testare.

Atât testele acute cât şi cele cronice de acumulare se realizează relativ uşor bazându-se pe norme standardizate conferind alternative de experimentare pe animale vertebrate, fără a cauza conflicte cu legile privind bunăstarea animalelor, mai ales în cazul utilizării pentru testare a embrionilor. Pe parcursul testelor se înregistrează modificările de comportament de-alungul întregii perioade de testare.

În cadrul testul de toxicitate acută, conform metodei se utilizează şapte peşti pentru fiecare concentraţie, cu un minim de cinci concentraţii pe test.

Limita testului este reprezentată de 100 mg/L substanţă de testare.

Peştii sunt expuşi pentru o perioadă de 96 h. Mortalitatea se înregistrează la 24, 48,72 şi 96 h. Totodată se va evalua şi concentraţia la care mor 50% din peşti (LC50) (Figura 2).



Figura 2. Înregistrarea mortalităţii la 24 h de la începerea testului.
(original Universitatea Szent Istvan, Ungaria)

Pentru ca testul să fie valid trebuie ca mortalitatea în acvariile de control să nu depăşească 10% la sfârşitul testului, iar concentraţia oxigenului dizolvat trebuie să fie cel puţin 60% din valoarea saturaţiei aerului pe parcursul testării (12).

2. Testele de toxicitatea solului

2.1. Testele pe artropode

2.1.1. Testul pe *Folsomia candida*

Este un test de 28 zile de reproducere şi supravieţuire la toxice, la fel ca cele descrise în Metoda de testare biologică: Test pentru măsurarea supravieţuirii şi reproducerii artropodelor expuse la contaminanţii din sol” Raport EPS 1/RM/47 (Septembrie 2007).

Metoda de testare biologică se utilizează pentru evaluarea toxicităţii letale şi subletale a probelor de material după cum urmează:

- Probe de sol prelevate de pe terenuri contaminate sau potenţial contaminate.
- Soluri pe care s-au realizat deversări sau tratamente de remediere.
- Material prelevat după drenarea apei.
- Sol pe care s-au depozitat reziduuri industriale.
- Sol contaminat cu poluanţi chimici.

Testul este invalid dacă rata supravieţuirii adulţilor (prima generaţie) în sol de control negativ, la sfârşitul testului este < 70% în sol natural şi < 80% în sol artificial (9).

2.2. Testele pe râme

2.2.1. Testul *Eisenia andrei*

Este un test de toxicitate în sol de 14 zile ca cele descrise la Metoda de testare biologică: *Teste de detectare a toxicității contaminanților din sol pe râme (Eisenia andrei, Eisenia fetida, sau Lumbricus terrestris)*” Raport EPS 1/RM/43 (Iunie 2004 cu amendamente din Iunie 2007)

Această metodă biologică de testare se utilizează pentru măsurarea toxicității a una sau mai multe probe, sau amestecuri de sol contaminat/ potențial contaminat, cu utilizarea râmelor drept organisme de testare. O probă de sol poate fi testată cu concentrație unică sau evaluată pentru toxicitate într-un test cu concentrații multiple, realizând o serie de concentrații prin amestecul unor cantități măsurate de sol de testare cu sol de control negativ sau sol de referință (8).

Râma *Eisenia andrei* (*Oligochaeta: Lumbricidae*) și artropodul *Folsomia candida* (*Collembola: Isotomidae*) sunt organisme selectate în testare datorită sensibilității la chimicale, având legătură cu abilitățile locomotorii care le permit să evite mediile contaminate (1)

2.2.2. Testul pe *Eisenia foetida foetida*

Pentru testele de toxicitate acută pe râme se preferă utilizarea râmei *Eisenia foetida foetida*, susceptibilă la chimicale, cu un ciclu de viață scurt, ajungând la maturitate în 7-8 săptămâni la 20°C.

2.2.2.1. Testul de screening (testul de contact pe hârtie de filtru)

Implică o expunere a râmelor la substanțele de testare pe hârtie de filtru impregnată în substanța respectivă, în vederea identificării chimicalelor cu potențial toxic din sol pentru râme. Înaintea testului propriu-zis se va realiza un test de constatare pentru a spori claritatea testului de screening.

Pentru testul principal de screening se vor utiliza cinci sau mai multe diluții seriate. Pentru fiecare diluție se vor realiza 10 repetări, în fiecare flacon regăsindu-se câte o râmă.

Precizia testului poate fi sporită prin realizarea a 20 de repetări. Pentru fiecare diluție se va realiza în paralel un flacon de control. Probele se mențin la întuneric timp de 48 h, cu înregistrarea opțională a mortalității după 72 h.

2.2.2.2. Testul cu sol artificial

Testul implică menținerea râmelor în probe definite de sol artificial în care se aplică o anumită concentrație din substanța de testare.

Mortalitatea se evaluează la șapte și 14 zile după aplicare, iar temperatura de testare va fi de 20±2°C.

Testele se realizează în lumină continuă pentru a ne asigura că râmele rămân în mediu de testare pe toată durata testului (13).

Pentru acuratețea testului de bază se vor realiza cinci concentrații în serie geometrică, necesare testului de constatare premergător celui principal.

Pentru fiecare test se va plasa o cantitate de 750 g mediu de testare într-un recipient de sticlă alături de 10 râme, care au fost ținute în prealabil, timp de 24 h, în sol artificial și spălate înaintea amplasării pe suprafața mediului de testare.

Recipientele se acoperă cu un film de plastic perforat pentru a preveni uscarea mediului de testare și menținerea în condiții de test timp de 14 zile. Se vor face patru repetări pentru fiecare tratament.

Pentru fiecare test se vor realiza patru flacoane de control, tratate cu același solvent care s-a utilizat în testare și cu un număr tot de 10 râme.

2.3. Testul pe *Tubifex tubifex*

Este utilizat adesea ca indicator de poluare a mediului în ciuda problemelor

taxonomice cauzate de plasticitatea fenotipică şi heterogenitatea genetică.

Cu toate acestea s-a dovedit că *Tubifex tubifex* este adesea tolerant la influenţa toxicelor de tipul cadmiului (2).

Excluderea contaminanţilor toxici din apă a fost studiată adesea dar în ultimii ani testele de excludere au fost realizate pentru soluri contaminate cu diferite substanţe chimice (1).

Potenţialul toxic al solurilor poluate cu metale se determină rapid şi cu costuri relativ mici prin utilizarea organismelor de testare de tipul râmelor. Râmele dau un răspuns mai puţin variabil la solurile poluate (avoidance test: teste de eficacitate biologică).

Aceste organisme sunt considerate instrumente de screening pentru scheme de evaluare a riscului ecologic ale terenurilor contaminate.

Tocmai datorită lipsei altor organisme care să cnpstituie instrumentele de screening relevante din punct de vedere ecologic şi eficiente cost-rapiditate au şi fost propuse iniţial metode de testare urmând a fi consacrate până în prezent.

Capacitatea organismelor de a detecta şi evita solurile contaminate relevă potenţialul stresor al acestor soluri şi are relevanţă ecologică datorită relaţiilor directe cu biodiversitatea solului şi calitatea acestuia ca habitat pentru organism.

Teste de poluarea solului s-au realizat pe artropode (*Collembola*), râme, oligochete (*Enchytraeidae*), toate fiind teste de modificare comportamentală (se observă care specii evită solurile contaminate şi dacă intensitatea răspunsului variază cu gradul de contaminare).

Oligochetele şi artropodele s-a dovedit că sunt sensibile la chimicale prin conformaţia anatomică deţin un sistem locomotor capabil să evite mediile nefavorabile (1).

Bibliografie

1. Natal Da Luz, T, Ribeiro, R, Sousa, JP (2004) - Avoidance tests with Collembola and Earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, no.9, pp. 2188-2193.
2. Sturmbauer, C, Gbadebo, BO, Niederstatter, H, Riedmann, A., Dallinger, R (1999) - Mitochondrial DNA Reveals Cryptic Oligochaete Species Differing in Cadmium Resistance, *Mol Biol Evol.*, vol. 16, no. 7, pp. 967-74.
3. *** Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Rainbow Trout EPS1/RM/09 (1990), <http://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=En&n=0BB80E7B-1>
4. *** Biological Test Method: Acute Lethality Test Using 'Daphnia' spp. EPS1/RM/11 (1990)
5. *** Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout EPS1/RM/13 (2000)
6. *** Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to 'Daphnia magna' EPS1/RM/14 (2000)
7. *** Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran ('*Ceriodaphnia dubia*') EPS1/RM/21 (2007)
8. *** Biological Test Method: Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms ('*Eisenia andrei*', '*Eisenia fetida*', or '*Lumbricus terrestris*') EPS1/RM/43, 2007.
9. *** Biological Test Method: Test for Measuring Survival and Reproduction of Springtails Exposed to Contaminants in Soil EPS 1/ RM/ 47, 2007.
10. *** Biological Test Method: Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows EPS 1/RM/22 (2011)
11. *** OECD 202 Guideline For Testing Of Chemicals." Daphnia sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test" (1984)
12. *** OECD 203 Guideline For Testing Of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test (1992)
13. *** OECD 207 Guidelines for the Testing of Chemicals/Section 2: Effects on Biotic Systems, Earthworm, Acute Toxicity Tests. (1984)
14. http://www.ebpi.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=59
15. www.web121.diywebsitemaker.com/Page/5226/0-1/Routine+Toxicity+Tests+Performed.aspx