

CZU: 541.49: 597: 574.64

BIOTESTAREA ȘI ESTIMAREA TOXICITĂȚII COMPUȘILOR METALLOORAGNICI ASUPRA POPULAȚIEI DE *PARAMECIUM CAUDATUM*

*Ion TODERAȘ**, Aurelian GULEA, Elena ROȘCOV, Olga GARBUZ

Universitatea de Stat din Moldova

*Institutul de Zoologie al AȘM

În articol este studiată influența unor grupuri de substanțe metaloorganice asupra microorganismelor acvatice. Este utilizată metoda de biotestare toxicologică a compușilor coordinațivi CMT-28 și CMA-18 asupra ciliatelor *Paramecium caudatum* Ehrnbg, în concentrații de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L, comparativ cu prototipul. Metoda de biotestare ne permite să formulăm rapid concluzii în plan comparat, evitând riscul unei erori înalte.

Proprietățile compușilor metaloorganici au fost cercetate prin metoda diluărilor în serie, în mediul nutritiv lichid (1 g soluție nutritivă/1 l apă). În calitate de culturi de referință au fost folosite ciliatele *Paramecium caudatum*.

Infuzoriile, ca obiecte de cercetare, sunt foarte comode, se reproduc destul de rapid, fiind cele mai convenabile test-obiecte pentru investigații în condiții de laborator, în care factorul timp joacă un rol decisiv, inclusiv pentru elucidarea impactului unor factori abiotici (substanțelor metaloorganice) asupra procesului de reproducere asexuată la *Paramecium caudatum*.

Activitatea substanțelor a fost evaluată după caracterul toxicității preparatelor (LT₅₀ și LC₅₀), iar activitatea ciliatelor a fost studiată după caracterul viabilității și parametrii reproductivi (creșterea sau diminuarea efectivului numeric și a ratei lor de reproducere).

Toxicitatea acută (LT₅₀ și LC₅₀) a compușilor a fost cercetată (conform recomandărilor metodice privind studierea toxicității generale a remediilor farmaceutice).

LC₅₀ (concentrația letală, 50%) – concentrația care cauzează moartea a 50% din test-organisme într-o anumită perioadă de timp.

LT₅₀ (timpul letal, 50%) – timpul în care concentrația utilizată a compusului testat cauzează moartea a 50% din organismele testate.

Cuvinte-cheie: *Paramecium caudatum*, ciliate, compuși coordinațivi, reproducere, toxicitate, efectiv numeric, rată de reproducere, concentrație letală, timp letal.

THE BIOASSAY AND ESTIMATION OF THE TOXICITY OF METALLOORGANIC COMPOUNDS IMPACTING THE POPULATION OF *PARAMECIUM CAUDATUM*

This work will focus on the study of groups of metalloorganic substances on aquatic organisms. Toxicological testing method of coordination compounds CMT-28 and CMA-18 is used on *Paramecium caudatum* Ehrnbg ciliates, at concentrations of 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L, compared to the prototype. Bioassay method allows us to develop fast and comparative conclusions, avoiding a high risk of errors.

The investigation of metalloorganic compounds was performed by the method of serial dilutions in the liquid nutrient medium (1 g nutrient solution / 1 l water). As a reference cultures were used ciliates *Paramecium caudatum*.

Infusorians, as objects of research are very comfortable, they reproduce quickly enough, being the most convenient test-objects for study in the laboratory conditions, because of time factor which plays a decisive role and also is more simple to elucidate the impact of abiotic factors (metalloorganic substances) on the process of asexual reproduction of *Paramecium caudatum*.

The activity of substances was evaluated according to the character of the toxicity of the preparations (LT₅₀ and LC₅₀), while the activity of ciliates was studied according to the character of viability and reproductive parameters (increasing or decreasing of numbers and their reproductive rate).

The acute toxicity study (LC₅₀ and LT₅₀) of the compounds was performed according to the methodical recommendations on overall toxicity of pharmaceutical remedies.

LC₅₀ (lethal concentration, 50%) – concentration which causes death of 50% of test-organisms in a given period of time.

LT₅₀ (lethal time, 50%) – time, during which the used concentration of the test compound causes the death of 50% of the test organisms.

Keywords: *Paramecium caudatum*, ciliates, coordination compounds, reproduction, toxicity, numbers, reproduction rate, lethal concentration, lethal time.

Introducere

La momentul actual infuzoriile prezintă unul dintre cele mai importante obiecte în biotehnologie. Ele pot fi utilizate în calitate de obiecte biotestabile în laboratoarele ecologice și toxicologice; în afară de aceasta, cultura de infuzorii poate servi ca hrană de bază pentru puietii de pești și este o sursă de proteine animale [1].

Infuzoriile sunt cele mai superior organizate organisme monocelulare. Datorită sensibilității lor specifice și dezvoltării ultrastructurii celulare, în particular – aparatului ciliar, ele sunt în stare să reacționeze la orice schimbare a mediului extern. În rândul acestor reacții se înscrie acțiunea compușilor chimici s.a. [2].

Din acest considerent, cercetarea evoluției și influenței acestor substanțe asupra grupelor dominante de hidrobionți are o importanță incontestabilă în soluționarea problemelor ce țin de determinarea toxicității unor compuși metaloorganici [3,4].

Așadar, scopul cercetărilor noastre a fost de a determina influența preparatelor coordinative asupra principalilor indici reproductivi (viabilitatea, efectivul numeric și rata de reproducere) ai organismelor monocelulare, precum evaluarea concentrației și a timpului letal al compușilor metaloorganici utilizați.

Diversitatea indivizilor asigură populației capacități mai mari de adaptare, comparativ cu cele ale unui individ luat în parte. Eficientizarea adaptării populației se realizează pe contul eliminării celor mai sensibili indivizi față de substanța toxică dată. Labilitatea populației asigură stabilitatea speciei, deoarece în populație este asigurată realizarea adaptărilor la noile condiții de mediu, inclusiv până la formarea de noi specii.

Material și metode

Proprietățile compușilor coordinativi CMT-28 și CMA-18 au fost cercetate prin metoda neîntreruptă de cultivare a ciliatelor propusă de E.Maupas (1887) [5] și B.Кокובה (1989) [6], și prin metoda diluărilor în mediul nutritiv al compușilor coordinativi (ca substanță nutritivă au servit drojdiile de panificație (masă uscată) *Saccharomyces cerevisiae* (1 g soluție nutritivă/1 l apă)). Substanțele inițiale sunt dizolvate până la concentrațiile necesare de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L. În calitate de material biologic experimental a servit cultura de *Paramecium caudatum* Ehrnb.

Speciile menționate au fost studiate prin utilizarea metodologiei hidrobiologice clasice pentru cercetarea parametrilor reproductivi ai populațiilor, a prolificității. Materialul protozoologic a fost prelucrat conform metodelor uzuale standard, propuse de T.Sonnenborn (1970) [7], K.Суханова (1968) [8], C.Curds, J.Vandyke (1966) [9], K.Хаусман (1988) [10], J.Dragesco (1979) [11].

Activitatea substanțelor a fost evaluată după caracterul inofensivității preparatelor, iar activitatea ciliatelor a fost studiată prin utilizarea metodologiei hidrobiologice clasice pentru cercetarea parametrilor reproductivi ai populației (parametrii reproductivi – creșterea sau diminuarea efectivului numeric și a ratei lor de reproducere) [12].

Evaluarea rezultatelor s-a efectuat vizual, cu ajutorul binocularului. Activitatea compușilor coordinativi CMT-28 și CMA-18 a fost apreciată în cazul schimbării cantitative a organismelor monocelulare și incapacității celulelor de a se înmulți în mediul nutritiv lichid timp de 8 zile.

Toxicitatea acută (LT_{50} și LC_{50}) a compușilor a fost cercetată în conformitate cu recomandările metodice privind studierea toxicității generale a remediilor CMT-28 și CMA-18 [13,14], prin introducerea în soluția nutritivă a substanțelor supuse investigației.

Rezultate și discuții

Substanțele CMT-28 și CMA-18 prezintă compuși coordinativi sintetizați la Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică a USM, Departamentul Chimie, de către academicianul A.Gulea.

Pentru evaluarea inofensivității s-a recurs la cercetarea acțiunii toxice generale și a toxicității reproductivă: determinarea concentrațiilor letale (LC_{50}), a timpului letal (LT_{50}) [3] și a sensibilității organismelor ciliate *Paramecium caudatum* (Fig.1) [15] la acțiunea preparatelor CMT-28 și CMA-18.



Fig.1. *Paramecium caudatum* Ehrnb.

La etapa inițială a fost determinat caracterul influenței CMT-28 asupra populației de ciliate, după criteriul viabilității culturii, în condiții concrete de cultivare. S-a stabilit că efectul preparatului coordinativ asupra viabilității ciliatelor, ce presupune capacitatea celulelor de a-și mări efectivul numeric, depinde de doza de administrare. Preparatul CMT-28 diminuează particularitățile reproductive în doze extremale (100-10 uM/L), termeni în care inhibă complet dezvoltarea organismelor acvatice. O tendință de creștere a efectivului numeric la dozele de 0,01-1 uM/L se observă în ziua a 7-a; totuși, această creștere se exprimă în valori mai joase (252,9-714,6) față de lotul martor (483,2-907,2), fapt ce denotă că mecanismul de acțiune a preparatului dat este toxic pentru paramecii (Fig.2).

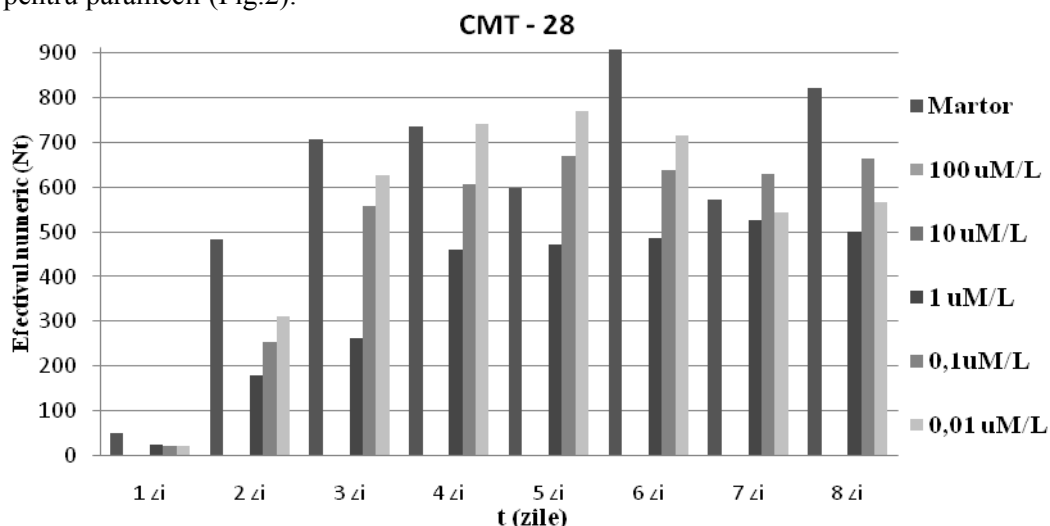


Fig.2. Variația efectivului numeric (Nt) al *P. caudatum* în funcție de condițiile trofice (CMT-28).

Valorile ratei de reproducere Cw la martor variază între 3,863 (prima zi) și 0,84 (a 8-a zi), cu o scădere treptată în următoarele zile. Pe când la concentrațiile joase de 1-0,01 uM/L valorile sunt mult mai joase: în prima zi Cw este de cca 2,9, iar în cea de a 8-a este cca 0,8. Așadar, se observă o diminuare a ratei de reproducere la acțiunea preparatului CMT-28.

În continuare, pentru a completa valoarea testului analizat, a fost determinată și intensitatea activității preparatului coordinativ CMA-18 asupra potențialului reproductiv la *P. caudatum* (Fig.3). S-a demonstrat clar, prin studii, că în primele zile de acțiune a acestuia cele mai eficiente s-au dovedit a fi concentrațiile de 0,1 și 0,01 uM/L.

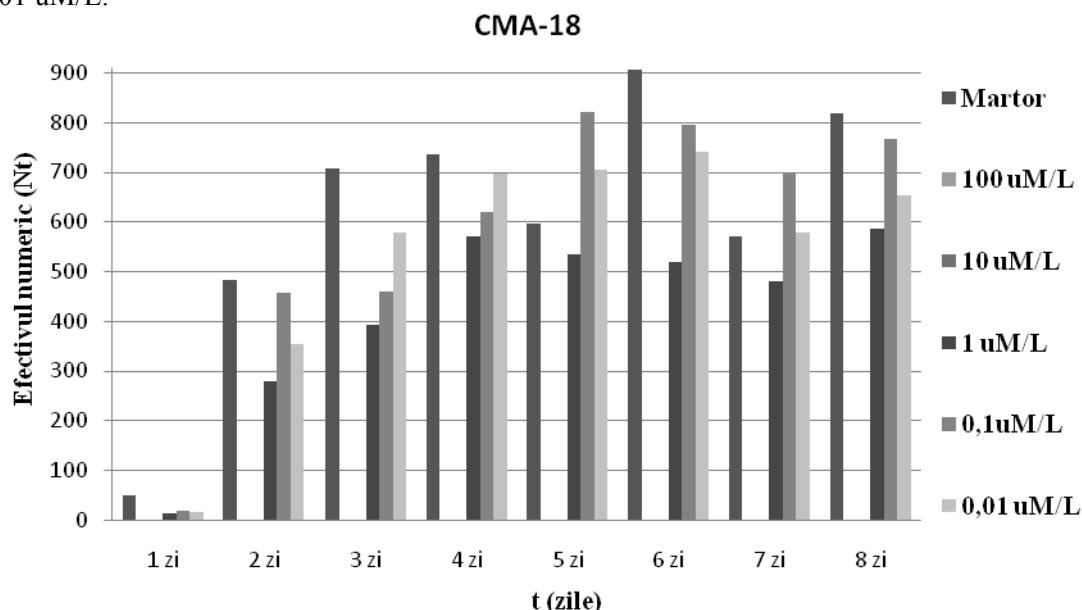


Fig.3. Variația efectivului numeric (Nt) al *P. caudatum* în funcție de condițiile trofice (CMA-18).

Coeficientul Nt are tendința de creștere în ziua a 5-a (valorile fiind 705,7-819,9) și a 7-a (cu valorile 652,4-768), dar valorile efectivului numeric nu depășește cu mult valorile prototipului (cu valorile 597,7-570,6). La concentrațiile de 100 și 10 uM/L crește toxicitatea preparatului, care este însoțită de eliminarea substanțială a infuzoriilor.

În fine, cu diminuarea efectivului numeric scade, respectiv, și rata lor de reproducere. La acțiunea preparatului CMA-18, în prezența dozelor 1-0,01 uM/L, are loc procesul de reținere a ratei de reproducere, fără eliminări decisive. Rata de reproducere constituie 3,86 - 0,84 (martor), 2,6-0,79 (1 uM/L), 2,95-0,82 (0,1 uM/L) și 2,64-0,79 (0,01 uM/L).

În cercetările efectuate au fost determinați parametrii toxicologici LT_{50} și LC_{50} după criteriul viabilității infuzoriilor *P. caudatum*.

LT_{50} (timpul letal) – timpul în care concentrația utilizată a compusului testat cauzează moartea a 50% din organismele testate.

LC_{50} (concentrația letală) – media concentrației letale, care provoacă moartea a 50% din infuzorii în perioada efectuării cercetărilor.

Metoda este bazată pe determinarea reacției infuzoriilor la adaosul în mediul nutritiv a substanțelor toxice [16]. Criteriul de acțiune toxică a substanțelor este apreciat după criteriul viabilității și densității indivizilor în cultură. Rezultatele biotestate privind determinarea acțiunii toxice asupra culturii *P. Caudatum* au fost prelucrate conform programei GraphPad.

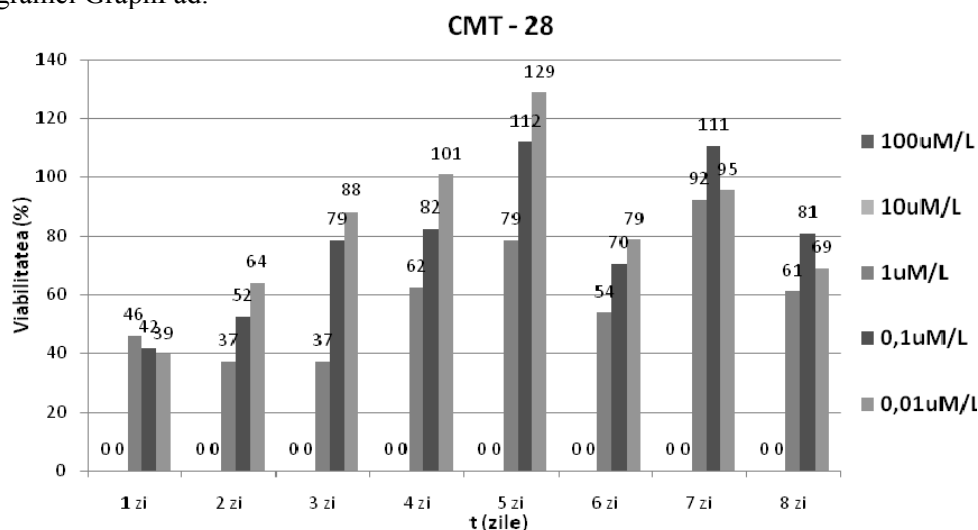


Fig.4. Dinamica creșterii populației *Paramecium caudatum* la acțiunea compusului CMT-28 în diferite concentrații.

Rezultatele experimentale privind activitatea compușilor metaloorganici sunt prezentate în Figura 4, din care reiese că compusul CMT-28 posedă activitate toxică în limitele concentrațiilor de 100 și 10 uM/L față de prototip.

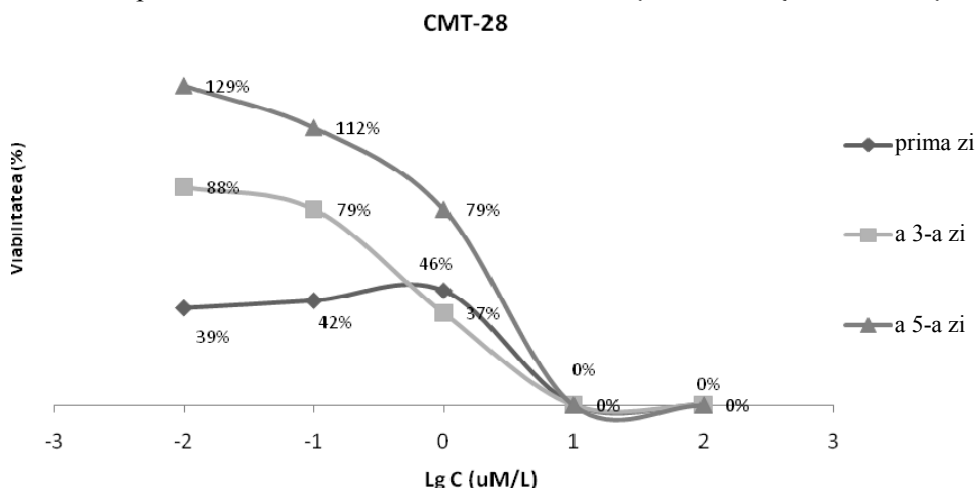


Fig.5. Inhibarea viabilității culturii de *P. caudatum* la acțiunea substanței coordinative CMT-28.

Rezultatele obținute demonstrează că LT_{50} al compusului investigat la concentrația de 100 și 10 $\mu\text{M/L}$ \leq în prima zi. La concentrația de 1 $\mu\text{M/L}$ LT_{50} este egal în cea de a 3-a zi, iar la concentrațiile de 0,1-0,01 $\mu\text{M/L}$, LT_{50} este egal în prima zi, față de lotul martor.

În ceea ce privește indicele LC_{50} , în prima zi de prelucrare este $\leq 0,01$ $\mu\text{M/L}$. În ziua a 2-a LC_{50} este egal cu 0,085 $\mu\text{M/L}$, în a 3-a zi = 0,46 $\mu\text{M/L}$, în a 4-a zi = 1,28 $\mu\text{M/L}$, în a 5-a zi = 1,3 $\mu\text{M/L}$, în a 6-a zi = 0,49 $\mu\text{M/L}$, în a 7-a zi = 1,56 $\mu\text{M/L}$ și în a 8-a zi = 0,86 $\mu\text{M/L}$ (Fig.5).

Rezultatele studiului activității complexului CMA-18 sunt prezentate în Figura 6, din care se vede că preparatul dat posedă activitate puțin toxică în limitele concentrațiilor de 1-0,01 $\mu\text{M/L}$ față de indivizii de microorganisme.

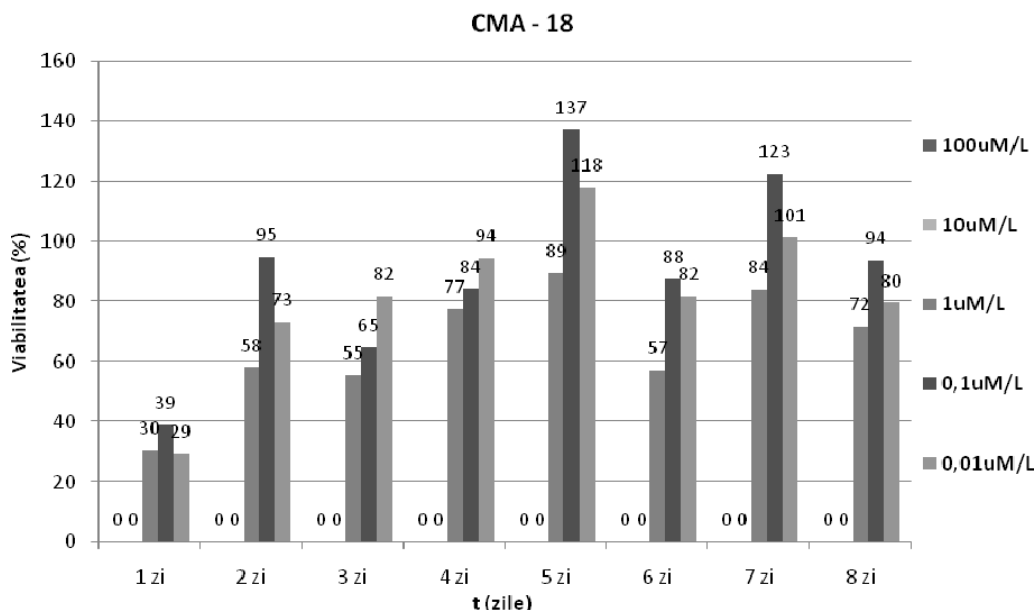


Fig.6. Dinamica creșterii populației *Paramecium caudatum* la acțiunea compusului CMA-18, în diferite concentrații.

La concentrația de 1 $\mu\text{M/L}$, LT_{50} este egal în a doua zi, iar la concentrația de 0,1 și 0,01 $\mu\text{M/L}$, LT_{50} este egal în prima zi. S-a stabilit că complexul studiat manifestă activitate toxică la concentrația de 100 și 10 $\mu\text{M/L}$, când valorile $LT_{50} \leq$ în prima zi.

În ceea ce privește indicele LC_{50} la acțiunea compusului coordonativ CMA-18, în prima zi ea este $\leq 0,01$ $\mu\text{M/L}$. În a 2-a zi $LC_{50} = 1,19$ $\mu\text{M/L}$, în a 3-a zi = 0,45 $\mu\text{M/L}$, în a 4-a zi = 1,67 $\mu\text{M/L}$, în a 5-a zi = 1,5 $\mu\text{M/L}$, în a 6-a zi = 1,13 $\mu\text{M/L}$, în a 7-a zi = 1,32 $\mu\text{M/L}$, iar în cea de a 8-a zi $LC_{50} = 1,47$ $\mu\text{M/L}$ (Fig.7).

Datele experimentale obținute demonstrează că compușii CMT-28 și CMA-18 posedă o activitate toxică în limitele concentrațiilor de 1-0,01 $\mu\text{M/L}$ față de microorganismele de laborator *Paramecium caudatum*, inhibând parțial parametrii reproductivi ai ciliatelor.

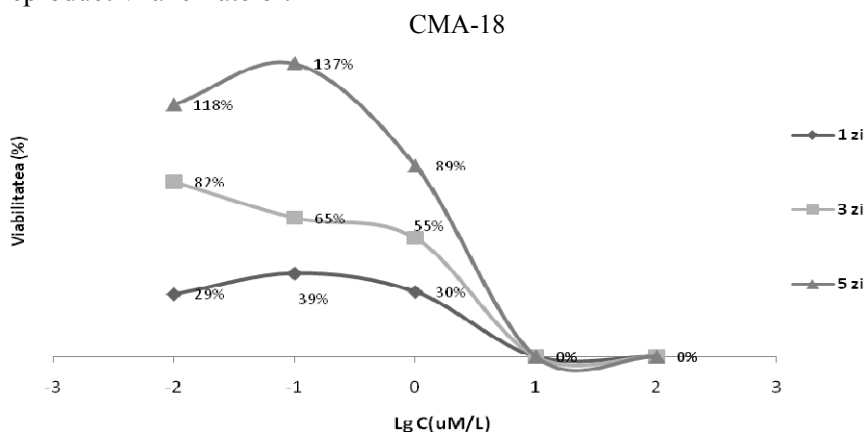


Fig.7. Inhibarea viabilității culturii de *P. caudatum* la acțiunea substanței coordonative CMA-18.

La concentrațiile mari de 100-10 uM/L s-a stabilit că complexii studiați manifestă activitate toxică asupra parametrilor reproductivi (viabilitatea, efectivul numeric și rata de reproducere) la populația dată.

Concluzii

1. S-a demonstrat că compușii coordinativi CMT-28 și CMA-18 la concentrațiile de 100 și 10 uM/L inhibă total creșterea și diviziunea infuzoriilor.

2. În diapazonul de concentrații 0,01-10 uM/L au fost calculate valorile LC_{50} (concentrația letală, 50%) și LT_{50} (timpul letal, 50%) pentru substanțele CMT-28 și CMA-18. Astfel, pentru CMT-28 $LC_{50}= 0,46$ uM/L, iar pentru CMA-18 $LC_{50}= 1,19$ uM/L. De aici rezultă că CMA-18 este mai puțin toxic în raport cu CMT-28.

3. Timpul letal (LT_{50}) pentru CMA-18, la concentrația de 1 uM/L, este cea de a 3-a zi, iar LT_{50} pentru CMT-28, la concentrația de 1 uM/L, este ziua a 2-a.

4. Rezultatele raportate mai sus atestă stabilitatea activă a substanțelor și absența rezistenței la test-obiectul *Paramecium caudatum*.

Referințe:

1. ЧУБИК, П.С., НЕЧАЕВА, Л.Н., БРЫЛИН, В.И. *Способ определения токсичности химических веществ в водной среде*. Томский политехнический университет, 1998.
2. ЛОТОВА, Н.С. *Определение качества вод хемотоксическим методом на примере водных объектов Санкт-Петербурга и Ленинградской области*. Ишимский педагогический институт им. П.П.Ершова, ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет», г.Ишим, Тюменская область.
3. ВИДИНЕЕВА, Т.И. Сравнительная оценка методов определения токсичности природных и сточных вод. В: *XXXIV Неделя науки СпбГПУ*: Материалы межвузовской научно-технической конференции (Электронный ресурс) - Режим доступа: <http://elib.spbstu.ru/dl/006634.pdf/download/006634.pdf?Lang=en> (Accesat: 25.03.2015)
4. *Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств*. Москва, МЗ РФ, 1997.
5. МАУПАС, Е. La rajeunissement karyogamique chez les cilies. En: *Arch. Zool. Exp. et Gen.* (2), 1889, vol.7, p.149-517.
6. КОКОВА, В. *Непрерывное культивирование*. Москва: Наука, 1989, с.113-137.
7. SOMEORN, T. Methods in *Paramecium* research. In: *Methods in cell physiology*. Vol.4. / Ed. D.M Prescott. N.Y.: Acad.presp. 1970, vol.4, p.241-339.
8. СУХАНОВА, К. *Температурные адаптации у простейших*. Ленинград: Наука, 1968. 234 с.
9. CURDS, C., VANDYKE, J. The feeding habits and growth rates of some fresh – water ciliates found in activated - sludge plantp. In: *J. appl. ecol.*, 1966, vol.3, no.1, p.121-137.
10. ХАУСМАН, К. *Протозология*. Москва: Мир, 1988. 334 с.
11. DRAGESCO, J., DRAGESCO-KERNEIS, A. Ciliés muscicoles nouveaux ou peu connus. In: *Acta. Protozool.*, 1979, vol.13, p.231-232.
12. ЗАЙКА, В. *Сравнительная продуктивность гидробионтов*. Киев, 1983, с.11-14.
13. *Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств*. Москва, МЗ РФ, 1977.
14. PRISACARI, V., BURACIOV, S., DIZDARI, A., STOLEICOV, S. Izohidrafural – remediu nou antibacterian. Comunicare II. Studiul toxicității, proprietăților dermato-rezorbitive, iritante și acțiuni terapeutice. În: *Analele Științifice ale USMF „N.Testemițanu”*, Chișinău, 2003, p.243-247.
15. <http://fineartamerica.com/featured/3-paramecium-caudatum-m-i-walker.html>
16. PRISACARI, V., BURACIOV, S., ȚAPCOV, V., GULEA, A. *Efectul antibacterian al unor compuși organici noi din rândul sulfanilamidelor*. Chișinău: Laboratorul „Infecții intraspitalicești” USMF „N.Testemițanu”; Catedra Chimie Anorganică și Fizică a USM.

Prezentat la 01.11.2016