

Edyta CHRZANOWSKA, Radosław KALINOWSKI, Marek BRYTAN

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Zakład Farmakologii i Toksykologii
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa
e-mail: e.chrzanowska86@gmail.com, tel. 514 181 280

Ocena fitotoksyczności wybranych bojowych środków trujących w stosunku do jednokomórkowych zielenic

Następstwem rozwoju cywilizacyjnego jest pojawienie się związków toksycznych w środowisku naturalnym człowieka. Obecność coraz większej ilości substancji szkodliwych w naszym otoczeniu początkowo wynikała z niezamierzonego uwalniania ubocznych produktów bądź odpadów procesów technologicznych. Kolejne pojawiające się w środowisku toksyny były efektem walki ze szkodnikami, a część z nich, wykazująca najwyższą toksyczność, została użyta w celach militarnych. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy miały na celu ocenę wpływu wybranych fosforoorganicznych bojowych środków trujących na wzrost jednokomórkowych glonów - *Chlorella vulgaris* i *Desmodesmus armatus*. Najniższą toksyczność w stosunku do glonów wykazywał VX, dla którego wartość IC50-72h wynosiła 41,2 mg/l dla *Desmodesmus armatus* oraz 39,6 mg/l dla *Chlorella vulgaris*. Wartość IC50-72h w przypadku somanu była dwukrotnie niższa i wynosiła 19,5 mg/l dla *Desmodesmus armatus* i 7,9 mg/l dla *Chlorella vulgaris*. Największą toksyczność w stosunku do glonów wykazywał sarin (IC50-72h 10,6 mg/l oraz 13,6 mg/l odpowiednio dla *Desmodesmus armatus* i *Chlorella vulgaris*). Wartości NOEC-72h w przypadku VX wynosiły 3,2 i 6,3 mg/l odpowiednio dla *Desmodesmus armatus* i *Chlorella vulgaris*. W przypadku sarinu i somanu wartości NOEC-72h były niższe niż 3,2 mg/l dla obu gatunków glonów.

Słowa kluczowe: bojowe środki trujące, soman, sarin, VX, zielenice, *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris*

Wstęp

Związki fosforoorganiczne są jedną ze szczególnie toksycznych grup tzw. bojowych środków trujących (BST). Przykładami BST są tabun, sarin, soman, cyklosarin oraz VX. Pod względem budowy chemicznej są to organiczne estry kwasu fosforowego, fosfonowego i tiofosfonowego; bezbarwne ciecze, dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, zazwyczaj słabo rozpuszczalne w wodzie (przykładowo: soman - 2,1 g/100 g H₂O, cyklosarin - 3,7 g/100 g H₂O, VX - 5,0 /100 g H₂O) [1]. Ich lotność jest na ogół niewielka, ale z reguły wystarczająca do wytworzenia w atmosferze stężeń par wielokrotnie przewyższających stężenia letalne dla człowieka i zwierząt doświadczalnych [2, 3].

Substancje te były szczegółowo badane w Niemczech w okresie II wojny światowej, gdzie ustalono ich wysoką przydatność do celów militarnych. Obecnie stanowią one najważniejszą grupę BST.

Związki fosforoorganiczne znalazły również zastosowanie jako środki ochrony roślin (DDVP, Demeton, Dipterex, Metasystox, Malation, Mipafox, Thiomedon i in.) oraz leki (głównie przeciw pasożytnicze). Substancje te łatwo wchłaniają się przez drogi oddechowe, przewód pokarmowy i skórę [4, 5].

Fosforoorganiczne BST pod względem chemicznym przypominają insektycydy fosforoorganiczne, jednak kliniczne objawy zatrucia nimi, a także postępowanie terapeutyczne mogą się nieco różnić ze względu na zdecydowanie niższą toksyczność środków ochrony roślin [2-6].

Działanie toksyczne związków fosforoorganicznych polega na inhibicji czynności katalitycznych enzymów, przy czym największą swoistość inhibicyjną wykazują one względem acetylocholinoesterazy. Enzym ten odpowiada za powstawanie i przekazywanie impulsów nerwowych w przywspółczulnym układzie nerwowym [6]. Efektem działania substancji fosforoorganicznych u organizmów zwierzęcych i u człowieka jest więc nadmierne pobudzenie, a następnie porażenie układu nerwowego, w którym przekaźnikiem bodźców jest acetylocholina [7].

Dokonanie procedur oceny ryzyka środowiskowego oraz stale istniejące zagrożenie terrorystyczne, niosące za sobą możliwość uwolnienia do ekosystemów wysokotoksycznych związków fosforoorganicznych, wymagają posiadania informacji nie tylko o toksyczności BST w stosunku do człowieka, ale także innych, biotycznych składowych ekosystemów. Stąd też celem niniejszej pracy była ocena wpływu wybranych fosforoorganicznych BST na jednokomórkowe zielonice wodne.

1. Metodyka badań

Do badań użyto następujących fosforoorganicznych bojowych środków trujących:

- somanu (ester pinakolinowy kwasu metylofluorofosfonowego, CAS: 96-64-0),
- sarinu (ester izopropylowy kwasu metylofluorofosfonowego, CAS: 107-44-8),
- VX (ester O-etyloS-2(diizopropylamino)etylowy kwasu metylotiofosfonowego, CAS:50782-69-9),

wyprodukowanych przez Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii (Warszawa), o czystości > 99%. Roztwory podstawowe (10%) przygotowano w izopropanolu (użyta w teście ilość rozpuszczalnika nie wywoływała negatywnych efektów u badanych organizmów, prezentowane w pracy wyniki podane zostały w odniesieniu do próby kontrolnej).

Badanie prowadzono na zielenicach *Chlorella vulgaris* i *Desmodesmus armatus* (Sammlung von Algekulturen, Göttingen), będących standardowymi organizmami w testach ekotoksykologicznych w środowisku wodnym.

Test wykonano zgodnie z metodyką ISO 8692 [8]. Badania przeprowadzono w zakresie stężeń 100÷12,5 mg/l (przy ilorazie postępu geometrycznego rozcieńczeń $q = 2$). Próby inkubowano w temperaturze 21°C przez 72 h, przy oświetleniu 7000 luksów, w cyklu dzień: noc 16:8. Gęstość komórek po upływie 24, 48, 72 h od rozpoczęcia doświadczenia, określano metodą bezpośredniego zliczania w komorach planktonowych Sedgwicka-Raftera pod mikroskopem optycznym.

Wartości IC50-72h obliczono metodą probitową, wartości NOEC-72h uzyskano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji i test Dunetta. Wszystkie eksperymenty wykonano w 3 powtórzeniach. Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z powtórzeń. Klasyfikacji toksyczności dokonano z uwzględnieniem kryteriów GHS [9].

2. Wyniki badań

Wyniki badań w postaci wartości IC50-72h i NOEC-72h przedstawiono w tabeli 1. Najniższą toksyczność w stosunku do glonów wykazywał VX - wartości IC50-72h wynosiły około 40 mg/l. W przypadku somanu były przeszło dwukrotnie niższe i wynosiły 19,5 i 7,9 mg/l odpowiednio dla *Desmodermus armatus* i *Chlorella vulgaris*. IC50-72h dla sarinu były w przybliżeniu 4-krotnie niższe niż dla VX i wynosiły 10,6 mg/l i 13,6 mg/l odpowiednio dla *Desmodermus armatus* i *Chlorella vulgaris*. Wartości NOEC-72h dla VX wynosiły 3,2 mg/l, 6,3 mg/l odpowiednio dla *Desmodermus armatus* i *Chlorella vulgaris*. W przypadku sarinu i somanu wartości NOEC-72h były niższe niż 3,2 mg/l dla obu gatunków glonów. W odniesieniu do toksyczności ostrej VX i sarin klasyfikowane są w III kategorii, soman z kolei w II dla *Chlorella vulgaris* i w III dla *Desmodermus armatus*.

Tabela 1

Wartości IC50-72h i NOEC-72h dla badanych związków

Związek	<i>Desmodermus armatus</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
	IC50-72h (95% przedział ufności) mg/l	NOEC-72h (95% przedział ufności) mg/l	IC50-72h (95% przedział ufności) mg/l	NOEC-72h (95% przedział ufności) mg/l
VX	41,2 (40,1÷42,3)	3,2 p = 0,05	39,6 (38,4÷40,8)	6,3 p = 0,05
Soman	19,5 (19,3÷19,7)	< 3,2	7,9 (7,7÷8,1)	< 3,2
Sarin	10,6 (10,3÷10,9)	< 3,2	13,6 (13,3÷13,9)	< 3,2

3. Dyskusja

Wśród dostępnych publikacji na temat wpływu BST na organizmy żywe brak jest informacji odnośnie do oddziaływania tych substancji na jednokomórkowe zielenice. W związku z powyższym uzyskane wyniki porównywano do danych dotyczących wpływu insektycydów fosforoorganicznych na glony. Związki te stanowiące pochodne kwasu fosforowego stosowane są na szeroką skalę w rolnictwie, sadownictwie i warzywnictwie.

Sabater i Carrasco, w badaniach dotyczących wpływu insektycydu fosforoorganicznego pyridafentionu na różne gatunki glonów wykazali, zarówno zahamowanie wzrostu i fotosyntezy, jak również znacznie wyższą fitotoksyczność insektycydów fosforoorganicznych w porównaniu do herbicydów (chlorosulfuron, molinat). Gatunkiem glonów najbardziej wrażliwym na działanie pyridafentionu w stosunku do hamowania wzrostu i fotosyntezy okazał się *Scenedesmus subspicatus*, dla którego EC50 wynosiło 2,2 mg/l, w przypadku *Chlorella vulgaris* 14,5 mg/l [10].

Zahamowanie fotosyntezy przez inny insektycyd fosforoorganiczny wykazał również Butler. Paration w stężeniu 1,0 mg/l powodował inhibicję fotosyntezy w blisko 10%. Z kolei Cole i Plapp w swoich badaniach pokazali, że paration podawany w tym samym stężeniu (1 mg/l) nie wpływał na ograniczenie procesu fotosyntezy u zielenicy *Chlorella pyrenoidosa*, powodował natomiast znaczne zahamowanie wzrostu u tych glonów. Paration stosowany w ilości 10 mg/l wpływał hamująco zarówno na fotosyntezę, jak również na wzrost tego gatunku glonów [11, 12].

Do podobnych wniosków doszli również Kent i Currie. Fenintron wywoływał zahamowanie wzrostu u 9 z 12 badanych gatunków glonów przy stężeniu 1,0 mg/l bądź wyższym. Inhibicja wzrostu wahała się w granicach od 15% (*Chlorella vulgaris*) do 96% (*Chlamydomonas reinhardtii*). W przypadku niższego stężenia (0,1 mg/l) nie zaobserwowano efektów toksycznych u żadnej z 12 grup badanych glonów [13].

Yeh i Chen w swojej pracy przedstawili wpływ 4 insektycydów fosforoorganicznych (malation, dichlorwos, fenthion, paration) na glony z gatunku *Pseudokirchneriella subcapitata*. Toksyczne działanie insektycydów było wywołane blokowaniem cytochromu P-450 i w następstwie tego zahamowaniem procesu fotosyntezy. Podane wyniki uzyskano na podstawie pomiaru gęstości komórek glonów. Najbardziej toksyczny okazał się paration (EC50 - 0,92 mg/l), następnie fenthion (EC50 - 1,05 mg/l), najniższą toksycznością charakteryzowały się dichlorwos (EC50 - 1,62 mg/l) i malation (EC50 - 2,32 mg/l). Wartości NOEC w przypadku badanych insektycydów były niższe niż 0,5 mg/l [4].

Sanderson i in. jako jedyni w dostępnej literaturze dostarczyli informacji na temat oddziaływania bojowych środków trujących na glony. Autorzy dokonali oszacowania toksyczności kilkudziesięciu bojowych środków trujących w oparciu o modele QSAR dla poszczególnych grup substancji chemicznych w odniesieniu do ryb, skorupiaków i glonów. Przedstawione w pracy Sandersona wartości toksyczności w stosunku do glonów są niższe w porównaniu z wynikami prezentowanymi powyżej. Według autorów, najwyższą toksyczność wykazywał VX, dla którego toksyczność w stosunku do glonów była 20-krotnie wyższa niż przedstawiona w niniejszej pracy i wynosiła 2,3 mg/l. Kolejny pod względem toksyczności jest soman - 2,7 mg/l. Za najmniej toksyczny Sanderson i in. uznali sarin [14]. Podana przez nich wartość 10,3 mg/l zbliżona jest do uzyskanej w niniejszej pracy. Otrzymane wyniki wskazują, że fitotoksyczność BST w stosunku

do jednokomórkowych glonów jest niższa niż insektycydów fosforoorganicznych.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań wskazują na zróżnicowaną toksyczność fosforoorganicznych bojowych środków trujących na organizmy roślinne. Pomimo tego, że w środowisku glebowym sarin jest substancją nietrwałą (okres półtrwania < 24 h), w środowisku wodnym okazał się najbardziej toksyczny. Związek VX stanowiący potencjalnie największe zagrożenie dla człowieka ze wszystkich badanych substancji (w porównaniu do sarinu około 170-krotnie niższa dawka letalna w przypadku zatrucia przezskórnego) wykazywał najniższą fitotoksyczność w teście wzrostowym.

Na podstawie IC₅₀-72h dla badanych substancji można stwierdzić, że oba gatunki zielenic wykazują podobną wrażliwość na szkodliwe działanie związków fosforoorganicznych.

Literatura

- [1] Romano J.A., Lukey B.J., Salem H., Chemical Warfare Agents Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, CRC Press, Boca Raton 2008.
- [2] Seńczuk W., Toksykologia współczesna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
- [3] Sidell F.R., Takafuji E.T., Franz D.R., Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Textbook of Military Medicine, Washington 1997.
- [4] Yeh H.J., Chen Ch.Y., Toxicity assesment of pesticides to *Pseudokirchneriella subcapitata* under air-tight test environment, Journal of Hazadrous Materials A 2006, 131, 1-3, 6-12.
- [5] Cortós-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Espinosa-Aguirre J.J., Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable, Toxicology Letters 2001, 125, 1-3, 39-49.
- [6] Kaczmarek A., Gorb L., Sadlej A.J., Sarin and soman: Structure and properties, Structural Chemistry 2003, 15, 2, 514-525.
- [7] D'Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R., Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 912, 2, 294-299.
- [8] Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2004(E).
- [9] Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), United Nations, New York, Geneva 2005.
- [10] Sabater C., Carrasco J.M., Effects of pyridaphenthion on growth of five freshwater species of phytoplankton, A laboratory study, Chemosphere 2001, 44, 8, 1775-1781.
- [11] Butler G.L., Algae and pesticides, Residue Reviews 1977, 66, 19-61.
- [12] Cole D.R., Plapp F.W., Inhibition of growth and photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* by a polichlorinated biphenyl and several insecticides, Environmental Entomology 1974, 3, 2, 217-220.

- [13] Kent R.A., Currie D., Predicting of algal sensitivity to a pesticide stress, *Environmental Toxicology and Chemistry* 1995, 14, 6, 983-991.
- [14] Sanderson H., Fauser P., Thomsen M., Sorensen P.B., PBT screening profile of chemical warfare agents, *Journal of Hazardous Materials* 2007, 148, 1-2, 210-215.

The Assessment of Fitotoxicity of Selected Chemical Warfare Agents on Unicellular Green Algae

The consequence of civilization development is the emergence of toxic compounds in the environment. The presence of an increasing number of harmful substances in our environment, initially stemmed from the accidental release of waste by-products or processes. Another emerging toxins in the environment were the result of pesticides, and some of them, showing the highest toxicity, was used for military purposes. The aim of this paper is to evaluate the effect of selected organophosphorus warfare agents on the growth of unicellular algae - *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus armatus*. The lowest toxicity to algae showed VX, for which the IC_{50-72h} was 41.2 mg/L for *Desmodesmus armatus* and 39.6 mg/L for *Chlorella vulgaris*. The IC_{50-72h} in the case of soman was twice lower at 19.5 mg/L for *Desmodesmus armatus* and 7.9 mg/L for *Chlorella vulgaris*. The highest toxicity to algae had sarin (IC_{50-72h} 10.6 mg/L and 13.6 mg/L respectively for *Desmodesmus armatus* and *Chlorella vulgaris*). 72h-NOEC values in the case of VX were 3.2 mg/L, 6.3 mg/L, respectively *Desmodesmus armatus* and *Chlorella vulgaris*. In the case of sarin and soman-72h NOEC values were lower than 3.2 mg/L for both species of algae. Our results indicate a diverse toxicity of organophosphorus warfare agents on green algae. Sarin as an unstable substance in soil (half-life < 24 h) proved to be the most toxic in aquatic environment. The compound VX which is potentially the greatest threat (even 170 times lower lethal dose in case of poisoning transdermal) of all test substances showed the lowest phytotoxicity in the growth test. Green algae of the genus *Chlorella* organisms seem to be more vulnerable to the harmful effects of organophosphorus compounds than type *Desmodesmus*.

Keywords: chemical warfare agents, soman, sarin, VX, green algae, *Desmodesmus armatus*, *Chlorella vulgaris*