

ZASTOSOWANIE WSKAŹNIKÓW PRZYROSTU REAKCJI  
I TRWAŁOŚCI DZIAŁANIA DO TESTOWEGO ROZPOZNAWANIA  
TRUCIZN OWADOBÓJCZYCH W ILOŚCIACH ŚLADOWYCH

ALFRED KAMIŃSKI

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie

Biologiczną analizę ilościową trucizn owadobójczych na małych zwierzętach testowych można łatwo przeprowadzić posługując się odpowiednim wzorcem. Opracowano liczne metody na różnych zwierzętach — rozwielitkach, larwach komara oraz na muszkach owocowych *Drosophila*.

Trudniej jest określić metodami biologicznymi rodzaj trucizny w badanym materiale, zwłaszcza jeśli zawartość jej jest tak mała, że izolacja i analiza chemiczna jest zbyt trudna. Niekiedy wykonanie analizy chemicznej i przyrządowej napotyka na dodatkowe trudności związane z obecnością licznych zanieczyszczeń i metabolitów.

Analiza biologiczna jakościowa posługuje się wieloma kryteriami rozpoznawania trucizn.

1. Symptomatologia reakcji zwierząt na trucizny owadobójcze nie różni ich należycie. Z klucza symptomatologicznego można korzystać jedynie dla określenia przynależności grupowej trucizn np. do grupy węglowodorów chlorowanych lub fosforoorganicznych inhibitorów esterazy cholinowej. Co prawda HCH daje pobudzenie motoryczne przed porażeniem owadów słabiej zaznaczone niż w przypadku DDT, aldrina zaś prawie niewidoczne, to ujęcie w liczby tych różnic w zasadzie jest niemożliwe bez jakiejś specjalnej dotąd jeszcze nie ustalonej metody rejestracji ruchu owadów.

2. Klucz wielotestowego oznaczania stężeń granicznych można zastosować tylko w przypadku dysponowania większą ilością badanego materiału i gatunków zwierząt testowych. Jest jednak znacznie pewniejszy od symptomatologicznego.

3. Klucz wskaźników toksykodynamicznych jednotestowy, stanowi najodpowiedniejszy i najwygodniejszy sposób rozpoznawania trucizn. Utworzenie podstaw tego rodzaju klucza stało się celem obecnie prowadzonych doświadczeń.

Każda trucizna badana za pomocą analizy testowej charakteryzuje się swoistą prędkością przyrostu reakcji. Również trwałość porażenia jest swoista. W analizie jakościowej wykorzystano właśnie te fakty.

Najodpowiedniejszym zwierzęciem testowym w analizie małej ilości trucizn owadobójczych jest larwa jętki (*Cloeon dipterum*) (1, 2, 3). W ocenie hydrobiologów należy ona do tak zwanych mezosaprobów i znosi dość duże ilości zanieczyszczeń. Jest przy tym bardzo wrażliwa na trucizny owadobójcze.

Wykonanie analizy jednocześnie ilościowej i jakościowej polega na przygotowaniu szeregu rozcieńczeń badanego materiału w 16—20 krystalizatorach po 100 ml w wodzie wodociągowej odchlorowanej. Do ekstrakcji trucizn z tkanek zwierzęcych lub roślinnych posługiwano się roztworem 5-procentowym acetonu w wodzie. Zawartość zaś acetonu w kąpeli dla zwierząt nie powinna przekraczać 0,5 procent (objętościowo 20°). W oznaczaniu orientacyjnym stosuje się iloraz postępu rozcieńczeń 2, 1,5 lub 1,3. W szczegółowym zaś mniejszy: 1,2 lub 1,1 zależnie od stopnia wymaganej dokładności. Po umieszczeniu 40 zwierząt w każdym naczyniu, zapisuje się ich reakcję po upływie 1 godziny dla określenia 50D/1h w mikrogramach/ml i jednocześnie wydobywa się z każdego naczynia po 10 sztuk zwierząt za pomocą małej siateczki metalowej. Dokładnie przepłukane na siatce jętki przenosi się do równolegle ustawionego szeregu z czystą wodą po 50 ml w każdym. To samo powtarza się po 2 i 3 godzinach w celu oznaczenia D50/2h i D50/3h. Reszta zwierząt pozostaje w naczyniach macierzystych by po upływie 24 godzin kąpeli oznaczyć D50/24h, jedną z przyjętych metod dla małych grup zwierząt (Muencha i Reeda lub Wiechowskiego). Tak samo dokładnie po 24 godzinach kąpeli zwierząt odczytuje się wynik analizy także w szeregach w których przerwano kąpiel owadów po 1, 2 i 3 godzinach w celu oznaczenia D50/1hr, D50/2hr i D50/3hr dla określenia ewentualnej zmiany w liczbie porażonych zwierząt po 24 godzinnym przerwaniu kąpeli w truciźnie. Po oznaczeniu dawek przystępuje się do obliczenia wskaźników przyrostu reakcji i wskaźników jej odwracalności na podstawie wzorów. Wskaźnik przyrostu reakcji dla 1 godziny kąpeli

$$W_p/1h = \frac{D50/1h}{D50/24h}$$

W taki sam sposób oblicza się  $W_p/2h$  i  $W_p/3h$ .

Do obliczania wskaźników odwracalności reakcji służy wzór

$$W_o/1h = \frac{D50/1hr}{D50/1h}$$

W ten sposób oblicza się  $W_o/2h$  i  $W_o/3h$ .

Wobec nie znanej zawartości bezwzględnej trucizny w badanym materiale dawkę graniczną wyraża się oczywiście zawsze ułamkiem, który odpowiada stopniowi rozcieńczenia badanego wyciągu czy roztoru, np.  $\frac{1}{1}$ ;  $\frac{1}{1,30}$ ;  $\frac{1}{1,63}$  przy ilorazie postępu rozcieńczeń 1,3 lub  $\frac{1}{1}$ ,  $\frac{1}{1,1}$ ;  $\frac{1}{1,21}$  — przy ilorazie 1,1. Po obliczeniu średnich dawek metodą interpolacyjną uzyskane liczby nanosi się na tabelkę ułożoną według poniższego wzoru (tab.) i porównuje z wzorcową, którą powinna posiadać każda pracownia zajmująca się tego rodzaju analizami. Tabelka wzorcowa (tab.) powinna zawierać możliwie komplet praktycznie stosowanych trucizn owadobójczych. Przy czym wskazane jest by tabelki wzorcowe sporządziły laboratoria w swoim zakresie.

Tabela przyrostu reakcji testowej i odwracalności  
obiekt testowy *Cloeon dipterum*

| Nazwa trucizny                   | D50/24h<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Wskaźnik przyrostu<br>relacji $\frac{D50/24h}{Dt}$ |          |          | Wskaźnik odwracalności<br>po 24h = $\frac{Dtr}{Dt}$ |          |          |
|----------------------------------|---------------------------------|--|----------|----------|---|----------|----------|
|                                  |                                 | czas wchłaniania trucizny                          |          |          | czas wchłaniania trucizny                           |          |          |
|                                  |                                 | $t = 1h$   | $t = 2h$ | $t = 3h$ | $t = 1h$  | $t = 2h$ | $t = 3h$ |
| HCH                              | 0,200<br>$\pm 0,026$            | 0,281  | 0,80     | 0,90     | 0,93  | 8,00     | 6,36     |
| Aldrin                           | 0,025<br>$\pm 0,0034$           | 0,00028  | 0,025    | 0,062    | 0,00082   | 0,065    | 0,075    |
| Dipterex                         | 0,083<br>$\pm 0,0092$           | 0,0014   | 0,0086   | 0,033    | 0,85  | 1,00     | 1,25     |
| Baytex                           | 0,071<br>$\pm 0,0090$           | 0,0091   | 0,049    | 0,093    | 0,063   | 0,207    | 0,370    |
| Metasystox                       | 0,18<br>$\pm 0,011$             | 0,015  | 0,072    | 0,145    | 0,208   | 0,56     | 0,75     |
| Extr. Pyrethri<br>(20% pyretryn) | 0,032<br>$\pm 0,0037$           | 0,59   | 1,28     | 1,35     | 18,5  | 35       | 35       |

W razie niemożności oznaczenia wszystkich  $D50_t$  — zwłaszcza  $D50/1h$  z powodu zbyt małej ilości materiału można chociaż z nieco mniejszym prawdopodobieństwem korzystać tylko z  $D50/2h$  i  $D50/3h$  lub tylko z  $D50/3h$  znajdując potwierdzenie w drugiej liczbie wskaźnika odwracalności. Z podanej tabelki zawierającej wskaźniki przyrostu reakcji i odwracalności kontaktowych trucizn owadobójczych wynika, że liczby te stanowią wystarczające kryteria różnicujące w biologicznej analizie jakościowej. Z wielkości poszczególnych wskaźników można wywnioskować, że

pyretrum i HCH w dużym zakresie dawek wywołuje porażenie odwracalne. Aldrina daje porażenie późne nawet po krótkim, całkowicie bezobjawowym okresie wchłaniania i po długim okresie przerwania kontaktu. Uzyskane wskaźniki stanowią też pewną podstawę do ustalenia optymalnych dawek i czasu wchłaniania trucizn dających minimum lub maksimum odwracalności porażenia zwierząt.

### Streszczenie

Na podstawie wyników analiz biologicznych trucizn owadobójczych (HCH, Aldrin, Dipterex, Baytex, Metasystox, Extr. Pyrethri) w środowisku wodnym na larwach jętki (*Cloeon dipterum*) stwierdzono różnice w prędkości postępu reakcji testowej w szeregu analitycznym malejących stężeń trucizn charakterystyczne dla każdej trucizny. Te różnice określono odpowiednimi wskaźnikami liczbowymi. Oznaczono również wskaźniki odwracalności reakcji testowej dla zwierząt, którym w różnym czasie przzerwano kąpiel i przeniesiono do czystej wody. Jedne i drugie wskaźniki stanowią kryteria różnicujące trucizny w testowych analizach jakościowych. Trucizny o dużych wskaźnikach przyrostu reakcji (HCH, pyretryny) posiadają również duże wskaźniki odwracalności zatrucia. Proporcjonalnie trucizny o małych wskaźnikach przyrostu reakcji (Aldrin, Dipterex, Baytex, Metasystox) mają odpowiednio małe wskaźniki odwracalności.

### LITERATURA

1. Kamiński A. — Acta Physiol. Polon. 2, 245 (1957).
2. Kamiński A. — Angewandte Parasitologie 3, 19 (1962).
3. Nikonorow M., Cwiertniewska, E., Kamiński A. — Roczniki P. Z. H. 10, 237 (1959).

### DYSKUSJA

Dr Byrdy wyraża wątpliwość w przydatności larw jętki do badań toksykologicznych, gdyż nie udaje się ją hodować w warunkach laboratoryjnych. Jak każdy żywy organizm wykazuje dużą zmienność indywidualną zależną od wielu czynników jak wiek, płeć, stadia rozwojowe itp. co trudno jest ustalić gdy owad jest dziko łowiony. Okazało się np., że wśród much domowych samce są mniej odporne niż samice, przy czym odporność samic jest o 1,71 większa w stosunku do samców. Dlatego obiekt

testowy do badań biologicznych powinien być wyrównany i musi istnieć możliwość hodowania go w warunkach laboratoryjnych.

Badania biologiczne wymagają znacznie kłopotliwszych warunków do ich przeprowadzenia, i dlatego obok nich muszą być stosowane proste i łatwe metody fizyko-chemiczne, łatwe w zastosowaniu terenowym.

Dr Andrzejewski przypuszcza, że metody biologiczne referowane przez Dra Kamińskiego mogą mieć szerokie zastosowanie laboratoryjne. Ważnym jest jak przedstawia się powtarzalność wyników w obrębie grup badanych i czy zostało udowodnione statystycznie, że metodyka jest wiarygodna, jaki jest średni błąd, czas reakcji, ile jest używanych obiektów w grupie itp.

Dr Kamiński wyjaśnia, że hodowla laboratoryjna jętek sprawia pewne trudności. Natomiast wiek bardzo łatwo określić sitkiem. Owad ten rośnie skokowo i każde stadium charakteryzuje się określoną wielkością, i do badań testowych bierze się owady, które zbierają się na sitku o świetle 1,2 mm i przechodzą przez sitko o 1,5 mm. Należy jednak pamiętać, że wiek owada już całkowicie dojrzałego jest wielkością fizjologiczną tzn. jeżeli ma dobre warunki — jest młodszy, jeżeli złe — jest starszy. Mucha może być bardzo stara nawet po 2 dniach jeżeli ma braki w wilgotności, w żywieniu czy w wielkości pomieszczenia. Powtarzalność i dokładność metody na jętkach jest bardzo dobra, co zostało potwierdzone analizą statystyczną. Błąd metody biologicznej jest mniejszy niż błąd spektrofotometru. Stężenia stosowane wynoszą 0,003  $\mu\text{g}$  i są niedostępne dla metodyki fizyko-chemicznej.