

ZOOLOGIA

INFLUENȚA SUBSTANȚELOR COORDINATIVE
METALOORGANICE ASUPRA VIABILITĂȚII POPULAȚIEI DE
PARAMECIUM CAUDATUM

Toderăș Ion*, Gulea Aurelian**, Roșcov Elena**, Garbuz Olga**

*Institutul de Zoologie, **Universitatea de Stat din Moldova

Rezumat

În lucrare sunt prezentate rezultatele cercetării reacției culturii de laborator *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838 la acțiunea compușilor CMG-42 și CMG-33 în diferite concentrații 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L. A fost studiată sensibilitatea culturii de laborator *P. caudatum* la acțiunea substanțelor coordinative și posibilitatea de adaptare a acesteia la diferite concentrații. Toxicitatea a fost evaluată prin testarea parametrilor reproductivi și compararea lor cu martorul. A fost calculată dinamica, statistic semnificativă, dintre procesul de adaptabilitate și toxicitatea ciliatelor *Paramecium caudatum* la diferite concentrații. În final, au fost determinate concentrațiile optime ale unor substanțe și ale celor care au o influență toxică asupra viabilității organismelor unicelulare.

Cuvinte-cheie: *Paramecium caudatum*, ciliate, compuși coordinativi, reproducere, productivitate secundară, efectiv numeric, inhibiție.

Depus la redacție 19 septembrie 2016.

Adresa pentru corespondență: Roșcov Elena, Universitatea de Stat din Moldova, str. M. Kogălniceanu 65, MD-2009 Chisinău, Republica Moldova; E-mail: roscov.elena@gmail.com

Introducere

În prezent, metodele de bază, cu ajutorul cărora se apreciază condițiile ecologice în bazinele de apă, continuă să fie cele fizico-chimice. Totodată, pe lângă metodele analitice, se aplică pe scară tot mai largă metoda de testare biologică, care permite să se determine relația dintre condițiile de mediu și reacția organismelor vii [8, 17]. Cea mai eficientă este metoda bioindicatorilor care permite să se studieze acțiunea poluanților asupra organismelor vegetale și animale [12, 13]. Dat fiind faptul că unui biotop natural îi corespunde un grup specific de organisme, dereglările intervenite în parametrii de calitate ai compoziției ecosistemului conduc la restructurarea componentei specifice și a caracteristicilor de calitate ale comunității [6]. În cele din urmă, asemenea altor funcții, comportamentul reprezintă o reacție adaptivă a organismului la condițiile variabile ale mediului și este orientat spre asigurarea funcționării normale a acestuia [5]. Studiul proceselor biologice are o deosebită importanță practică, deoarece acestea determină atât calitatea apei, cât și eficientizarea productivității secundare a ecosistemelor acvatice [1, 2].

În calitate de test-obiect se folosesc organisme care sunt răspândite în natură, participă la procesul de epurare a apei și au un ciclu scurt de viață, fapt care permite urmărirea acțiunii factorilor dăunători asupra urmașilor. Aceste condiții sunt satisfăcute de infuzorii. Această alegere este argumentată, în primul rând, prin faptul că infuzoriile reprezintă indicatorii de bază ai apelor poluante; în al doilea rând, infuzoriile se deosebesc printr-o sensibilitate înaltă la toxicitatea apei și, în al treilea rând, ele sunt relativ accesibile pentru cercetări naturale și experiențe de laborator [14]. Biotestarea,

cu utilizarea infuzoriei *Paramecium caudatum*, poate servi ca o eficientă metodă ecologico-analitică de control a bazinelor în combinație cu metodele chimiei analitice [15]. Ca obiecte de cercetare, infuzoriile sunt foarte comode, ele fiind comparabile cu cele mai complexe și specializate celule, în care au loc procese caracteristice doar țesuturilor și organelor pluricelulare [19]. Totodată, spre deosebire de animalele metazoare, ciliatele se reproduc destul de rapid, ele fiind cele mai convenabile obiecte pentru studiul particularităților populaționale ale unei specii, inclusiv pentru clasificarea multor alte probleme ecologice în care factorul timpului joacă un rol decisiv [7].

Scopul cercetării a fost determinarea sensibilității culturii de laborator *Paramecium caudatum* la acțiunea substanțelor de natură organică și posibilitatea lor de adaptare la diferite concentrații. Toxicitatea a fost evaluată prin testarea parametrilor reproductivi, comparativ cu martorul și evaluarea ratei de reproducere și adaptabilitatea *P. caudatum* în diferite concentrații.

Materiale și metode de cercetare

A fost studiată sensibilitatea infuzoriei *Paramecium caudatum* la acțiunea substanțelor CMG-42 și CMG-33 cu concentrațiile de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L, în comparație cu martorul pe durata a 10 zile. Cercetările au fost efectuate asupra populației clonale de infuzorii *Paramecium caudatum*. Infuzoriile erau întreținute într-un mediu organic, bazat pe drojzii de panificație (masă uscată) *Saccharomyces cerevisiae* (1g drojdie/1 apă) [3], conform metodei de cultivare neîntreruptă [11], la temperatura de 30⁰ – 31⁰C. Probele erau menținute în termostat. Pe toată perioada de cercetare infuzoriile nu erau hrănite. Compușii coordonativi au fost pregătiți și oferți pentru cercetările respective de către Dnl Academician Gulea A. (Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Director Departamentului Chimie al Universității de Stat din Moldova).

Cultura-start a fost pregătită prin selectarea cu ajutorul unui microcapilar a indivizilor de paramecii și transferarea acestora în microcosme cu soluție nutritivă. După câteva zile de reproducere intensivă, când densitatea *P. caudatum* era mare, câteva celule-fice erau separate și introduse în microacvarii cu soluție nutritivă proaspătă, ce se menținea la aceeași temperatură până la obținerea unei culturi dense. Această cultură a fost folosită în calitate de material primar pentru cercetările experimentale. În retorte au fost introduse soluții cu concentrațiile de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L în raport cu martorul. Indivizii au fost inoculați în fiole, în câte 100 ml la fiecare concentrație, în care, în prealabil s-a repartizat câte 1 ml soluție nutritivă cu concentrațiile respective. Fiolele au fost amplasate în termostat la temperatura de 30⁰ – 31⁰C. Productivitatea specifică a infuzoriilor a fost determinată după viteza dividerii lor [18]. Evaluarea cantitativă a probelor se efectua zilnic. Această metodă a fost folosită pentru prima dată de către E. Maupas (1889) [4] pentru a determina ritmul de dividere în funcție de hrană și temperatură.

Rezultate și discuții

O atenție specială s-a acordat cercetărilor care furnizează informații despre nivelul de toxicitate al unor compuși chimici și influența acestora asupra potențialului de creștere a populațiilor de ciliate, contribuind la stabilirea dozelor stimulatorii și toxice. În prima serie de experimente a fost cercetată influența substanțelor CMG-42 și CMG-33 cu concentrațiile de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 uM/L, o probă fiind control. Pe parcursul acestei perioade fiolele erau plasate în termostat, la temperatura de 30⁰ – 31⁰C, cu iluminare permanentă.

S-a constatat că pe întreaga durată de cercetare, sub influența preparatului CMG-42, cu concentrațiile de 100 uM/L, efectivul numeric are valori eliminatorii chiar din primele zile de cultivare (Fig. 1).

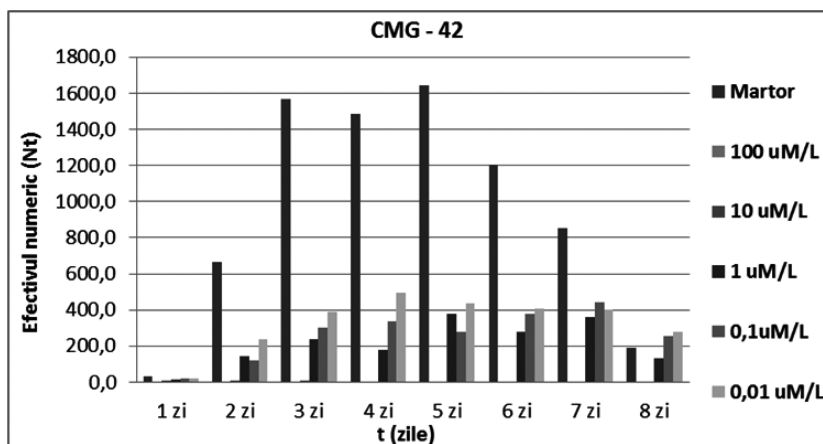


Figura 1. Variația efectivului numeric (Nt) al *P. caudatum* în funcție de condițiile trofice (CMG-42).

La concentrația de 10 uM/L, în primele zile de prelucrare a probelor, se observă o tendință de creștere nesemnificativă a Nt cu o scădere bruscă a acestui indice în cea de-a 4-a și a 6-a zi.

Sub acțiunea preparatului CMG-42 la concentrații 1-0,01 efectivul numeric este mai mic și variază de la 21 (1-a zi) până la 278 (a 8-a zi) la adăugarea a 0,01 uM/L, și de la 17 până la 256 (a 8-a zi) la adaosul de 0,1 mg/l, în lotul de control valorile fiind cuprinse între 31 (1-a zi) și 851 (a 7-a zi).

Așadar, preparatul CMG-42 a provocat diminuarea efectivului numeric al *Paramecium caudatum*.

În continuare, au fost întreprinse cercetări de punere în evidență a efectului compusului coordinativ CMG-33 (Fig.2).

S-a constatat că pe întreaga durată de cercetare, sub influența preparatului CMG-33, cu concentrațiile de 100 și 10 uM/L, efectivul numeric are valori eliminatorii chiar din primele zile de cultivare. În urma testării preparatului CMG-33 s-a constatat că pe întreaga durată de cercetare Nt a manifestat o tendință de creștere încă din primele zile la doza de 1-0,01 uM/L. Astfel, la concentrația de 0,01 uM/l, acest indice a fost cel mai înalt (cu 429,8 și 446,4) la a 3-ea și a 7-ea zi. La concentrația de 0,1 uM/L, efectivul numeric este în mică creștere față de concentrația 0,01 uM/L, valorile efectivului numeric sunt cuprinse între 435 (a 3-ea zi) și 407,9 (a 7-ea zi). La concentrația de 1 uM/L valorile Nt sunt de 306 (a 3-ea zi) și 421,9 (a 7-ea zi), pe când valorile martorului depășesc cu mult valorile sus menționate, 1567,8 (a 3-ea zi) și 851,8 (a 7-ea zi).

Astfel de tendință persistă și la concentrația de 1 uM/L, cu valori nesemnificative, față de lotul martor. Concentrațiile mari, de 100-10 uM/L, ale preparatului CMG-33 au determinat o acțiune toxică (cu pieirea indivizilor) asupra clonului de laborator începând cu primele zile de prelucrare a probelor experimentale.

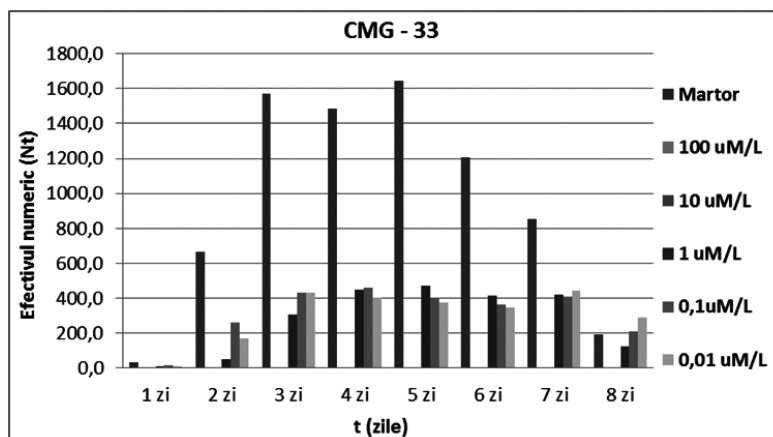


Figura 2. Variația efectivului numeric (Nt) al *P. caudatum* în funcție de condițiile trofice (CMG-33).

Rezultatele experimentale au demonstrat, că compușii coordinațivi (CMG-42 și CMG-33) testați pe ciliate, manifestă o acțiune toxică asupra parametrilor cantitativi și reproductivi ai parameciului la toate dozele administrate.

În același timp, rezultatele obținute sub acțiunea preparatului CMG-33 ne permit să constatăm că valori minime ale Cw au fost înregistrate la concentrații de 0,01-1 uM/L, cu o creștere lentă spre sfârșitul experienței față de proba control. Așadar, preparatele CMG-42 și CMG-33 au provocat diminuarea efectivului numeric al *Paramecium caudatum*.

O metodă suplimentară include determinarea parametrilor toxicologici LT50 și LC50, inclusiv calcularea ratei de diviziune a infuzoriilor.

Pentru aprecierea rezultatelor, conform metodei neîntrerupte, în cadrul experimentului se înregistrează indivizii pieriți, se evidențiază schimbările morfologice și comportamentul infuzoriilor. Pentru calcularea procentajului letal al ciliatelor se propune determinarea parametrilor LT50 și LC50.

LT50 - reprezintă media timpului de supraviețuire a 50% din indivizi în dependență de concentrații (Timpul Letal).

LC50 - reprezintă media concentrației letale, care provoacă moartea 50% a infuzoriilor în decurs de 8 zile (Concentrația Letală).

Metoda este bazată pe determinarea reacției infuzoriilor la adaosul în mediul nutritiv a substanțelor toxice. Criteriul de acțiune toxică a substanțelor este apreciat după criteriul de supraviețuire, reproducere și schimbarea densității indivizilor din cultură.

Totodată, aprecierea toxicității se realizează după acțiunea de inhibiție a substanțelor CMG-42 și CMG-33 utilizate asupra parametrului de supraviețuire a infuzoriilor.

Prelucrarea rezultatelor biotestării acțiunii toxice asupra culturii de laborator *Paramecium caudatum* a fost realizată cu ajutorul programului GraphPad.

Reacția infuzoriilor la toxicitatea preparatelor a fost determinată doar pentru datele obținute în primele zile a experimentelor.

Indicele toxicității a constituit calcularea cu exactitate a diminuării cantității de protozoare (supraviețuirea (%)) sub acțiunea compușilor testați în comparație cu martorul.

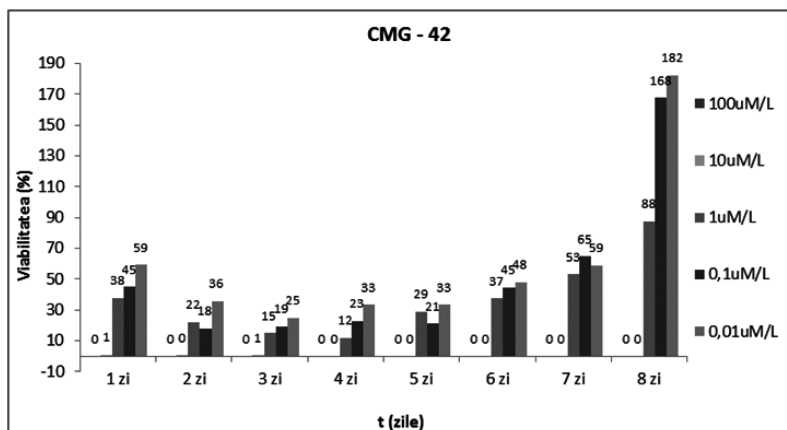


Figura 3. Dinamica creșterii populației *Paramecium caudatum*, la acțiunea compusului CMG-42, în diferite concentrații.

În baza datelor obținute, se poate conchide că, LT_{50} la concentrația 100 și 10 $\mu\text{M/L} \leq 1$ zi. LT_{50} , la concentrația de 1 $\mu\text{M/L}$ este egală în cea de a 7-a zi, iar la concentrațiile de 0,1-0,01 $\mu\text{M/L}$, LT_{50} este egal în cea de a 6-a zi, față de lotul martor (Fig. 3).

În ceea ce privește indicele LC_{50} , în prima zi de prelucrare este egal cu 0,049 $\mu\text{M/L}$. LC_{50} începând de la ziua a 2-a până la cea de a 6-a zi $\leq 0,01$ $\mu\text{M/L}$. În cea de a 7-a zi LC_{50} este egală cu 1,01 $\mu\text{M/L}$, iar în ziua a 8-a LC_{50} este egal cu 1,2 $\mu\text{M/L}$ (Fig. 4).

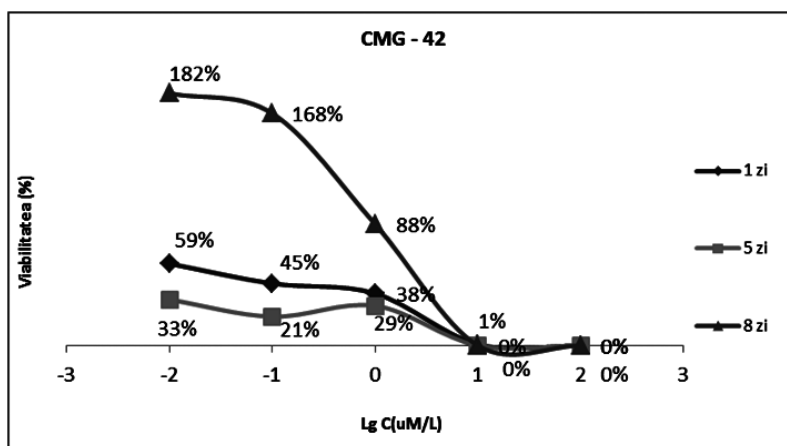


Figura 4. Inhibarea viabilității culturii de *P. caudatum* la acțiunea substanței coordinative CMG-42.

Conform rezultatelor prelucrate $LT_{50} \leq 1$ zi pentru concentrația 100 și 10 $\mu\text{M/L}$. La concentrația de 1 $\mu\text{M/L}$, $LT_{50} = 7$ zi, iar la concentrația de 0,1 $\mu\text{M/L}$, LT_{50} este egal în a 2-a și a 7-a zi (Fig. 5).

În ceea ce privește indicele LC_{50} , în prima zi este egală 0,18 $\mu\text{M/L}$. Începând cu ziua a 2-a până la a 6-a zi $LC_{50} \leq 0,01$ $\mu\text{M/L}$. În ziua a 7-a LC_{50} este egal cu 0,56 $\mu\text{M/L}$, iar în ziua a 8-a $LC_{50} = 1,34$ $\mu\text{M/L}$ (Fig. 6).

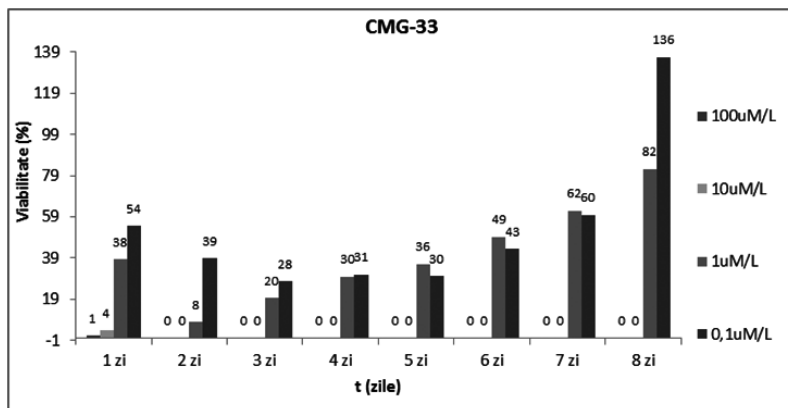


Figura 5. Dinamica creșterii populației *Paramecium caudatum*, la acțiunea compusului CMG-33, în diferite concentrații.

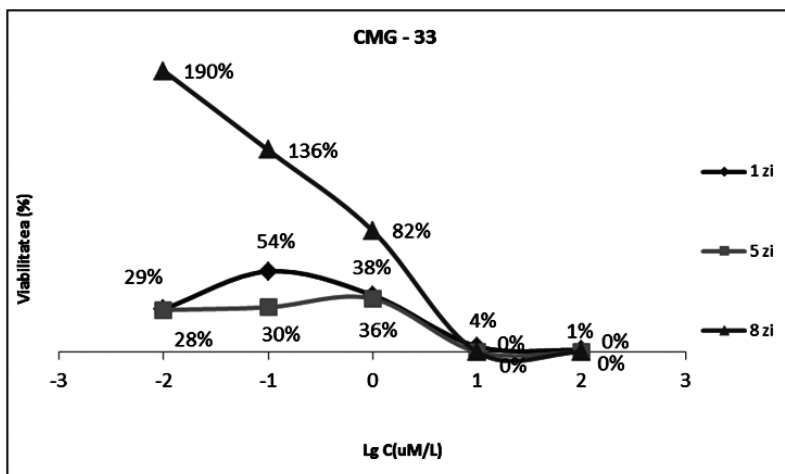


Figura 6. Inhibarea viabilității culturii de *P. caudatum* la acțiunea substanței coordinative CMG-33.

Analizând rezultatele obținute, putem menționa că preparatele CMG-42 și CMG-33 nu pot fi utilizate ca factori de reglare a efectivului numeric și a ratei de reproducere asupra culturii de *P. caudatum*. Cercetările efectuate cu utilizarea substanțelor coordinative, ne permit să conchidem, că nu s-a înregistrat o eficacitate înaltă la nici o concentrație.

Concluzii

În baza rezultatelor obținute, se poate afirma că preparatele testate la diferite concentrații nu stimulează capacitatea de reproducere în cultura de laborator *P. caudatum*. A fost demonstrat nivelul înalt de toxicitate al acestor compuși chimici sub acțiunea unor doze mari de 100, 10 μM/l.

Obiectul test *P. caudatum* manifestă o sensibilitate înaltă, dar totodată și o rezistență înaltă față de concentrațiile mici administrate 0,1-0,01 μM/L.

Lucrarea a fost realizată în cadrul proiectului instituțional 15.817.02.25F.

Bibliografia

1. *Fenchel T.* The ecology of marine microbenthos. II. The food of marine benthic ciliates, *Ophelia*, vol. 5, 1968a, p. 73-121.
2. *Fenchel T.* The ecology of marine microbenthos. II. The food of marine benthic ciliates, *Ophelia*, v.5, 1968b, p. 73-121.
3. *Madoni, P., Romeo M.G.* Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists // *Environmental Pollution*. – 2006. – V. 141 – P. 1-7.
4. *Maupas E.* La rajeunissement karyogamique chez les cilies. *Arch. Zool. Exp. et Gen.* (2), v. 7, 1889, p. 149-517.
5. *Mitra A., Flynn K.* Importance of interactions between food quality, quantity, and gut transit time on consumer feeding, growth, and trophic dynamics. *Am. Nat.* 169, 2007, p. 632–646.
6. *Radek R., Hausmann K.* Phagotrophy in ciliates. In: Hausmann K, Bradbury PC, eds. *Ciliates. Cells as organisms*, Stuttgart: Gustav Fisher, 1996, p. 197–219.
7. *Айвазова Л.Е., Гроздов А.О., Соколова С.А., Новосадова Т.Г., Трофимова М.Г.* Метод биотестирования с использованием инфузорий // *Методы биотестирования вод. - Черногловка*, 1988. С. 37-42.
8. *Бульон В., и др.* Микробальная “петля” в трофической сети озерного планктона. // *Журн. общ. биол.*, Т.60, № 4, 1999, с. 431-444.
9. *Белова М.А., Гумен С.Г., Зайцева И.И., Атанов А.Н.* Биотестирование различных водных сред с помощью инфузорий *Paramecium caudatum* // *Инфузории в биотестировании: Тез. докл. междунар. заочн. науч.-практ. конф. -С.-П.*, 1998. С. 133-134.
10. *Голубкова Э.Г.* Проведение токсикологических экспериментов с использованием парамеций: Методические указания для студентов биол. факультета. Петрозаводск. 1990. - 15 с.
11. *Мамаева, Н.В.* Инфузории бассейна р. Волги. Экологический очерк / Н. В.Мамаева. – Л.: Наука, 1979. – 150 с.
12. *Михайлова Л.В.* Интегральная оценка качества воды и донных отложений р. Тура // *Биоиндикация в мониторинге пресноводных систем: Тез. докл. междунар. конф. С.-П.*, 2006. - С. 103.
13. *Михайлова Л.В.* Расчет норматива предельно допустимого вредного воздействия (ПДВВ) на р. Тура в пределах Тюменской области // *Чистая вода: Тез. докл. конф. Тюмень*. 2006. - С. 26-29.
14. *Михайлова Л.В.* Современное состояние экосистемы реки Туры и ранжирование качества воды и донных отложений по комплексной экологической классификации // *Водный форум: Итоговые материалы*. Омск - Ханты-Мансийск. 2006. - С. 30-35.
15. *Селивановская С.Ю., Равзиева Г.М., Латынова В.З.* Биотестирование токсичности осадков сточных вод с использованием равноресничной инфузории // *Инфузории в биотестировании: Тез. докл. междунар. заочн. науч.-практ. конф. -С.-П.* 1998.-С. 175-176.
16. *Веселов Е.А.* Использование *Paramecium caudatum* для теста токсичности // *Мат. медико-биол. конф. Петрозаводск*, 1969. - С. 255-257.
17. *Шубернецкий И., Чорик Ф.* Эколого-фаунистические аспекты изучения кругоресничных инфузорий водоемов бассейна Днестра. В кн.: *Биогидроресурсы бассейна Днестра, их охрана и рациональное использование*, Кишинев, 1980, с. 34-76.
18. *Зайка В.* Сравнительная продуктивность гидробионтов. Киев, 1983, с. 11-14.
19. *Хаусман К.* Протозоология. Москва: Мир, V 266, 1988, 334 с.