

Edyta Chrzanowska*, Radosław Kalinowski*, Marek Brytan*

**OCENA ODDZIAŁYWANIA WOJSKOWYCH ODKAŻALNIKÓW
PROSZKOWYCH NA *LEMNA MINOR***

**THE ASSESSMENT OF IMPACT OF MILITARY SKIN
DECONTAMINANTS ON *LEMNA MINOR***

Słowa kluczowe: bojowe środki trujące, odkażalniki proszkowe, *Lemna minor*.

Key words: Chemical warfare agents, skin decontaminants, *Lemna minor*.

*Removal of chemical warfare agents from the body and equipment surface is mostly based on the use of military skin decontaminants. Imposed directly on body surface, they are meant to decompose, neutralize or remove chemical substances from contaminated areas. These substances contain relatively strong oxidants which may cause harmful effects on plant organisms during normal use - sprinkling a powder, as well as accidental release into the environment. The article presents the impact of three skin decontaminants containing chloramine B, chloramine T and triclosan, on the water plant (*Lemna minor*) in relation to growth (based on the measurements of leaf area, the frond number and wet weight) and biochemical parameters (contents of chlorophylls a and b). Triclosan proved to be the most toxic ($IC_{50-7d} < 0.39$). Decontaminants containing monochloramine B and T showed similar toxicity to *Lemna minor*. Slightly higher toxicity was observed for chloramine T based on growth parameters. Inverse relationship was observed for the IC_{50-7d} calculated based on the content of chlorophylls a and b in plants. All tested decontaminants at concentrations of 12.5 mg/dm^3 and higher caused complete necrosis of plants after 48 hours of the test.*

* **Mgr Edyta Chrzanowska, dr inż. Radosław Kalinowski, dr inż. Marek Brytan – Zakład Farmakologii i Toksykologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa; tel.: 514 181 280; e-mail: e.chrzanowska86@gmail.com; rkalinowski@wihe.waw.pl; mbrytan@wihe.waw.pl.**

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcano doskonaleniu metod likwidacji skażeń bojowymi środkami trującymi (BST) z powierzchni ciała, jednak wciąż brak jest informacji na temat szkodliwości działania tych substancji na środowisko.

Odkażalniki są to substancje chemiczne, ich roztwory i mieszaniny, które w czasie użycia powodują zmniejszenie ilości substancji skażającej, eliminując lub zmniejszając niebezpieczeństwo wywołania negatywnych skutków zdrowotnych u ludzi. Do częściowego odkażania powierzchni ciała, umundurowania oraz broni osobistej są wykorzystywane indywidualne pakiety przeciwchemiczne. Najczęściej w skład odkażalnika wchodzi substancja czynna, powodująca rozkład BST, oraz odpowiedni sorbent.

Rozkład BST za pomocą odkażalników następuje głównie w wyniku utleniania przez chlor, nadtlarki i reaktywne gazy oraz na drodze substytucji nukleofilowej za pomocą alkalicznej hydrolizy i oksymów [Antkowiak i in. 2011]. Do najprostszych odkażalników można zaliczyć 0,5% roztwór podchlorynu, który utlenia zarówno wiele toksycznych substancji przemysłowych (amoniak, związki cyjanowe itp.), jak i BST [Yang i in. 1992].

Główną funkcją sorbentów jest wiązanie cząsteczek, atomów lub jonów na swojej powierzchni (adsorpcja) lub w całej objętości (absorpcja). Jako sorbenty są stosowane związki organiczne (drewniane trociny, torf itp.) i nieorganiczne (glinokrzemiany, popioły, zeolity, rozdrobnione skały wapienne) oraz sztuczne (polietylenowe, poliuretanowe, polistyrenowe). Do dekontaminacji BST mogą posłużyć także sorbenty ogólnie dostępne, takie jak: czysty piasek, proszek do pieczenia, mąka, chleb. Sorbenty katalityczne (polioksometalany osadzone na polimerowej macierzy, materiały polimerowe), podobnie jak sorbenty reaktywne (żywice jonowymiennne), mają miejsca aktywne, które nie ulegają unieczynnieniu w reakcji z reagentem. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się nanosorbenty – struktury, których wymiar nie przekracza 100 nanometrów. Do tej grupy zaliczamy głównie tlenki metali: magnezu, glinu, tytanu. Zastosowanie nanotechnologii w procesie dekontaminacji zwiększa powierzchnię sorpcyjną 20–30 razy w stosunku do tradycyjnych sorbentów [Antkowiak i in. 2011, Yang i in. 1992].

Indywidualne pakiety przeciwchemiczne stosowane w armiach wielu państw różnią się w zależności od substancji czynnej bądź sorbentu. Polski indywidualny pakiet przeciwchemiczny (IPP 95), opracowany przez Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii oraz Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii, ma w swoim składzie sorbent – zeolit oraz chloraminy B, skuteczną w przypadku skażenia iperytem oraz związkiem VX. Do wyposażenia Sił Zbrojnych RP wprowadzono również indywidualny pakiet do likwidacji skażeń (IPLS-1), różniący się od IPP 95 dobranym odkażalnikiem proszkowym oraz środkiem do odkażania sprzętu osobistego.

Amerykański pakiet M291 wykorzystuje właściwości adsorpcyjne żywic jonowymiennych (Ambergard XE 555) do usuwania BST z powierzchni ciała i odzieży. Podob-

ne właściwości odkażająco-neutralizujące ma kanadyjski pakiet RSDL (Reactive Skin Decontamination Lotion). Zawiera on 1,25-molowy roztwór soli potasowej monooksymu 2,3-butanodionu w eterze monoetylowym glikolu polietylenowego. Zasadą działania RSDL jest izolacja skażenia od powłok ciała, a następnie rozkład BST. Dostępne obecnie pakiety są przeznaczone do usuwania substancji toksycznych jedynie z powierzchni skóry. RSDL, jako jedyny, pozostawiony na ranach powierzchniowych nawet przez kilka godzin, nie powoduje uszkodzenia tkanek. Na podstawie tego odkażalnika powstał amerykański zestaw LPDS (Low-Cost Personal Decontamination System), zawierający gąbkę nasyconą RSDL oraz wielowarstwową ściereczkę pełniącą funkcję sorbentu [Sidell i in. 1997].

Celem niniejszej pracy jest ocena oddziaływania wybranych odkażalników proszkowych, stosowanych lub rozważanych do stosowania w Siłach Zbrojnych RP, na modelowe makrofity – *Lemna minor*.

2. MATERIAŁY I METODY

Badane substancje

Do badań wytypowano 3 odkażalniki proszkowe, stanowiące mieszaninę substancji czynnej zawierającej aktywny chlor, sorbentu i wypełniacza:

- 1) odkażalnik I (IPP 95) – chloramina B (38%), tlenek cynku (5%), zeolit (50%), stearynian magnezu (7%);
- 2) odkażalnik II – chloramina T (30%), tlenek magnezu (65%), stearynian magnezu (5 %);
- 3) odkażalnik III – triklosan (30%), tlenek magnezu (65%), stearynian magnezu (5%).

W przeprowadzonym doświadczeniu, jako organizm testowy, wykorzystano rzęśę drobną *Lemna minor* – roślinę unoszącą się na powierzchni zbiorników wodnych, najbardziej narażoną na substancje powierzchniowo czynne, hydrofobowe, koncentrujące się na powierzchni wody.

Ocena fitotoksyczności

Badania przeprowadzono zgodnie z wytycznymi OECD [2006], w warunkach statycznych, w temperaturze 24°C, przez 7 dni, przy ciągłym oświetleniu ok. 8000 luksów. Jako medium badawcze wykorzystano pożywkę SIS [Swedish... 1995]. Do testów użyto stężeń z zakresu 0,39–100 mg/dm³ (przy ilorazie postępu geometrycznego szeregu rozcieńczeń q=2). Jako punkty końcowe testu przyjęto ilość listków, całkowitą powierzchnię listków, mokrą masę oraz zawartość chlorofili a i b w roślinach. Powierzchnię listków określono stosując oprogramowanie do cyfrowej analizy obrazu UTHSCSA ImageTool (ver. 3.0). Organizmy testowe pochodziły z hodowli własnej Pracowni Ekotoksykologii Zakładu Farmakologii i Toksykologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii.

Ocena zawartości chlorofilu a i b

Rośliny, po 7-dniowym wzroście w odkaźalnikach, przepłukano wodą destylowaną, osuszono liginą, zważono i przetrzymywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia analiz zawartości chlorofilu a i b. Próbki homogenizowano w schłodzonym, 80% roztworze wodnym acetonu, następnie pozostawiono na 24 h w temperaturze 4°C . Zawartość chlorofilu oznaczono na podstawie równania Humphreya i Jeffreya [Humphrey i Jeffrey 1997]:

$$\begin{aligned} \text{chl a} &= -1,93 \cdot A_{647} + 11,93 \cdot A_{664} \\ \text{chl b} &= 20,36 \cdot A_{647} - 5,50 \cdot A_{664} \end{aligned}$$

gdzie: A_{647} , A_{664} – wartości absorbancji prób przy odpowiednich długościach fali; chl a, chl b – zawartość chlorofilu a i b, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Wartości stężeń efektywnych obliczono metodą probitową. Wszystkie badania wykonano w 3 powtórzeniach. Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z powtórzeń.

3. WYNIKI

Wyniki badań nad wpływem wybranych odkaźalników proszkowych na rozwój rośliny *Lemna minor* pozwoliły na określenie wartości stężeń inhibicyjnych tych mieszanin w stosunku do wzrostu (w oparciu o pomiar przyrostu powierzchni, ilości listków i mokrej masy) oraz parametrów biochemicznych (zawartości chlorofilu a i b) (tab. 1).

Tabela 1. Wartości stężeń EC50 uzyskanych po 7-dniowej ekspozycji organizmów na działanie odkaźalników

Table 1. Effective concentrations EC50 after 7 days of exposure of plant organisms to decontaminants

Punkt końcowy testu	EC50-7d, mg/dm ³ (95% przedział ufności)		
	odkaźalnik I	odkaźalnik II	odkaźalnik III
Ilość listków	2,37 (1,31–4,28)	1,61 (0,55–2,74)	<0,39
Powierzchnia listków	1,04 (0,87–1,21)	1,01 (0,40–1,61)	<0,39
Mokra masa	0,76 (0,60–0,96)	0,59 (0,54–0,64)	<0,39
Zawartość chlorofilu a	7,54 (4,80–10,28)	8,50 (6,09–10,91)	<0,39
Zawartość chlorofilu b	7,60 (5,07–10,13)	8,37 (6,83–9,91)	<0,39

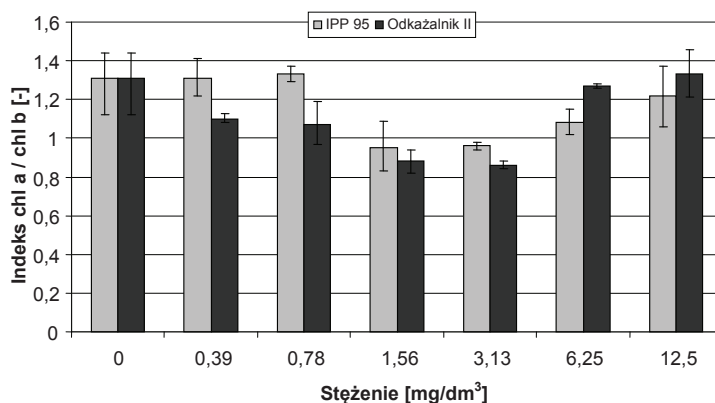
Spośród badanych odkażalników najbardziej toksyczna okazała się mieszanina zawierająca jako substancję czynną triklosan. Odkażalniki zawierające monochloraminy T i B wykazywały zbliżoną toksyczność w stosunku do *Lemna minor*, przy czym nieco większą toksyczność zaobserwowano w przypadku odkażalnika zawierającego chloraminę T w zakresie badań dotyczącym wzrostu. Odwrotną zależność zaobserwowano w odniesieniu do wartości EC50-7d obliczonych na podstawie zawartości chlorofili a i b w roślinach.

Wszystkie badane odkażalniki w stężeniach $>12,5$ mg/dm³ spowodowały całkowitą nekrozę listków po 48 godzinach trwania testu. W próbach o stężeniach $> 1,56$ mg/dm³ zaobserwowano także wyraźne objawy chlorozy (odbarwienia fragmentów listków).

W odniesieniu do stężeń 1,56–0,39 mg/dm³ zaobserwowano nieznaczny (do 15%) wzrost zawartości chlorofilu a zarówno w próbach z odkażalnikiem zawierającym chloraminę T, jak i chloraminę B. Podobny efekt stwierdzono w przypadku chlorofilu b w stężeniach $< 3,13$ mg/dm³.

Z wybranych do oceny toksyczności punktów końcowych testu największa czułość charakteryzowała pomiar mokrej masy roślin, najmniejsza zaś pomiar ilości listków. Zawartość chlorofili a i b była 4 do 10 razy mniej czułym parametrem oceny ekotoksyczności mieszanin niż wskaźniki wzrostu roślin.

Na podstawie zawartości chlorofili a (chl_a) i b (chl_b) określono ich wzajemny stosunek w *Lemna minor* (rys. 1). W warunkach niskich stężeń testowanych substancji ($\leq 3,13$ mg/dm³), odkażalnik zawierający chloraminę T wywoływał zmniejszenie wartości tego stosunku w porównaniu z IPP 95. W wyższych stężeniach zaobserwowano odwrotną zależność. Przy ekspozycji roślin na stężenia 1,56 mg/dm³ i 3,13 mg/dm³ zaobserwowano istotne zmniejszenie wartości indeksu chl_a/chl_b, zarówno w porównaniu z kontrolą, jak i pozostałymi stężeniami. Efekt ten wymaga dalszych, dokładniejszych badań, ponieważ w świetle prezentowanych wyników nie znajduje wytłumaczenia.



Rys. 1. Wpływ badanych odkażalników na zmiany stosunku chl_a/chl_b

Fig. 1. The influence of tested decontaminants on the changes of the chl_a/chl_b ratio

4. DYSKUSJA

W dostępnej literaturze nie ma wielu danych dotyczących oddziaływania wojskowych odkaźników proszkowych na rzęsę drobną. W związku z tym uzyskane wyniki porównywano głównie z danymi dotyczącymi oddziaływania badanych substancji odkażających na niektóre rośliny uprawne oraz glony.

Orvos i in., jako nieliczni, prowadzili badania nad wpływem jednego z przedstawionych w niniejszej pracy odkaźników – triklosanu, na rzęsę (*Lemna gibba* L.) oraz niektóre gatunki glonów: *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum*. Przedstawione przez autorów wyniki badań wskazywały na znacznie większą, w porównaniu z rzęsą wodną, wrażliwość glonów na działanie triklosanu, czego przejawem było widoczne zmniejszenie szybkości wzrostu. Wartości EC50-3d były niższe niż zaprezentowane w niniejszej pracy i wynosiły odpowiednio: >62,5 µg/dm³, 2,8 µg/dm³, 4,46 µg/dm³, dla: *Lemna gibba* L., *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum* [Orvos i in. 2002].

Toksyczność tego związku w stosunku do niektórych roślin uprawnych (*Brassica rapa*, *Triticum aestivum*), była znacznie mniejsza, na co wskazują badania prowadzone przez Amorim i in. Pierwszy z badanych organizmów roślinnych cechował się większą wrażliwością na działanie odkaźnika, co zaobserwowano na podstawie widocznie ograniczonego wzrostu pędów oraz, podobnie jak w przypadku rzęsy, chlorozy liści. Wartości EC50-21d dla *Brassica rapa* i *Triticum aestivum* wynosiły odpowiednio: 148 oraz 887 mg/kg [Amorim i in. 2010].

Podobne wyniki otrzymali Liu i in. [2009], badając wpływ triklosanu na wzrost pędów i korzeni *Oryza sativa* L. i *Cucumis dativus* L. Wartości EC50 w przypadku zahamowania wzrostu pędów wynosiły: 243 mg/kg dla *Oryza sativa* L. oraz 277 mg/kg dla *Cucumis dativus* L. Badane gatunki roślin wykazały znacznie większą wrażliwość na działanie triklosanu drugiego badanego parametru, którym był wzrost korzeni – EC50 wynosiły odpowiednio: 57 mg/kg i 108 mg/kg dla *Oryza sativa* L. i *Cucumis dativus* L. Zahamowanie wydłużania korzeni występowało już pod wpływem dawek triklosanu takich jak: 10 mg/kg (*Oryza sativa* L.) i 30 mg/kg (*Cucumis dativus* L.) [Liu i in. 2009]. Zielenice są niezwykle wrażliwe na działanie badanej substancji, czego dowodzą badania Franza i in. [2008]. W wyniku 24-godzinnej ekspozycji *Scenedesmus vacuolatus* na działanie triklosanu badacze zauważyli znaczne zahamowanie fotosyntezy i podziałów komórkowych. Określona przez tych autorów wartość EC50-24h w stosunku do zahamowania podziałów komórkowych wynosiła 1,9 mg/dm³ [Franz i in. 2008].

Date i in. [2005] badali wpływ chloraminy na wzrost sałaty *Lactuca sativa* L., w zależności od stężenia i czasu ekspozycji rośliny na badaną substancję. Do obserwowanych efektów badacze zaliczyli również brązowienie korzeni. Chloramina była stosowana w postaci kwasu chlorowego dodawanego do roztworu pożywki zawierającego jony amonowe (0,67 mM NH₄⁺). Przeprowadzone badania wykazały, że nawet niewielkie stężenie chlora-

miny ($0,3 \text{ mg Cl/dm}^3$) w pożywce oraz krótki czas ekspozycji (1 godzina) wywołują znaczne zmniejszenie tempa wzrostu oraz zmianę barwy korzeni, czego przyczyną jest ograniczenie przez chloraminę aktywności fizjologicznej (respiracja, pobieranie wody) u badanych roślin. Wraz ze wzrostem stężenia chloraminy oraz czasem ekspozycji obserwowano nasilenie efektów toksycznych [Date i in. 2005].

Toksyczny efekt chloraminy w stosunku do krasnorostów *Porphyra yezoensis* wykazał Maruyama i in. [1988]. Autorzy ci porównywali toksyczność roztworów zawierających chloraminę oraz chlor. Roztwór zawierający chloraminę okazał się być ok. 100 razy bardziej toksyczny niż roztwór zawierający chlor, co jest tłumaczone znacznie większą stabilnością chloraminy w roztworach wodnych. Wartości LC50-10d wynosiły odpowiednio: $0,03$ i $2,3 \text{ mg/dm}^3$ dla roztworów zawierających chloraminę i chlor [Maruyama i in. 1988].

Do podobnych wniosków doszedł Adachi i in. [2004], porównując wpływ monochloraminy i wolnego chloru na wzrost zielenic *Selenastrum capricornutum*. Otrzymane przez badaczy wyniki wskazywały na zdecydowanie większą toksyczność monochloraminy, która wywoływała inhibicję wzrostu w stężeniu powyżej $0,1 \text{ mg/dm}^3$, podczas 24-godzinnej ekspozycji badanych organizmów na jej działanie. Stan ten utrzymywał się do 96. godziny ekspozycji glonów na badaną substancję. Chlor natomiast wywoływał wyraźną inhibicję wzrostu dopiero w stężeniu 10-krotnie większym (1 mg/dm^3) [Adachi i in. 2004].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają dane przedstawione przez innych autorów, wskazując na znacznie większą toksyczność działania triklosanu w stosunku do roślin, w porównaniu z innymi odkaźnikami zawierającymi chloraminę. Wrażliwość wodnych organizmów roślinnych na działanie zarówno triklosanu, jak i chloraminy jest większa niż roślin uprawnych, przy czym chloramina wywiera mniejszy efekt toksyczny niż triklosan.

5. WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań wskazują na zróżnicowaną toksyczność badanych odkaźników proszkowych, zawierających substancje o silnych właściwościach utleniających. Związkiem wykazującym najsilniejsze działanie ekotoksyczne względem rzęsy wodnej okazał się triklosan (EC_{50-7d} dla badanych parametrów $< 0,39 \text{ mg/dm}^3$).

Odkaźniki zawierające chloraminę T i B wykazywały zbliżoną toksyczność w stosunku do rzęsy wodnej. Jednak wszystkie badane odkaźniki w stężeniach $> 12,5 \text{ mg/dm}^3$ spowodowały całkowitą nekrozę roślin po 48 godzinach trwania testu. W próbach o stężeniach $> 1,56 \text{ mg/dm}^3$ zaobserwowano także wyraźne objawy chlorozy.

Z wybranych do oceny toksyczności punktów końcowych testu największa czułość charakteryzowała pomiar mokrej masy roślin, najmniejsza zaś – pomiar ilości listków. Zawartość chlorofili a i b była od 4 do 10 razy mniej czułym parametrem oceny ekotoksyczności mieszanin niż wskaźniki wzrostu roślin.

PIŚMIENNICTWO

- ADACHI A., MATSUSCHITA K., YATA Y., OKANO T. 2004. Effects of rice bran on the growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* by chlorine and monochloramine. *Journal of Health Science* 50(6): 613–618.
- AMORIM M. J. B., OLIVEIRA E., SOARES A. M. V., SCOTT-FORDSMAND J. J. 2010. Predicted no effect concentration (PNEC) for triclosan to terrestrial species (invertebrates and plants). *Environmental International* 36(4): 338–343.
- ANTKOWIAK O., BRYTAN M., ZDANOWSKI R., KALINOWSKI R. 2011. Współczesne możliwości dekontaminacji bojowych środków trujących z powierzchni ciała. *Lekarz Wojskowy* 89(2): 111–115.
- DATE S., TERABAYASHI S., KOBAYASHI J., FUJIME Y. 2005. Effects of chloramines concentration in nutrient solution and exposure on plants growth in hydroponically cultured lettuce. *Scientia Horticulturae* 103(3): 257–265.
- FRANZ S., ALTENBURGER R., HEILMEIER H., SCHMITT-JANSEN M. 2008. What contributes to the sensivity of microalgae to triclosan. *Aquatic toxicology* 90(2): 102–108.
- HUMPHREY G.F., JEFFREY S.W. 1997. Test of accuracy of spectrophotometric equations for the simultaneous determination of chlorophylls a, b, c1 and c2. *UNESCO Publications*: 616–621.
- LIU F., YING G. G., YANG L. H., ZHOU Q. X. 2009. Terrestrial ecotoxicological effects on the antimicrobial agent triclosan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1): 86–92.
- MARUYAMA T., OCHIAI K., MIURA A., YOSHIDA T. 1988. Effects of chloramine on the growth of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Nippon Suisan Gakkaishi* 54(10): 1829–1834.
- OECD 2006. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test: 22.
- ORVOS D. R., VERSTEEG D. J., INAUEN J., CAPDEVIELLE M., ROTHENSTEIN A., CUNNINGHAN V. 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(7): 1338–1349.
- SIDELL F. R., TAKAFUJI E. T., FRANZ D. R. 1997. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Textbook of Military Medicine, Washington.
- Swedish Institute of Standards 1995. Water quality – determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed.** SS 02 82 13: 15.
- YANG Y., BAKER J. A., WARD R. 1992. Decontamination of chemical warfare agents. *Chemical Reviews* 92(8): 1729–1743.