

Radosław Kalinowski*, Edyta Chrzanowska*, Marek Brytan*

**OCENA EKOTOKSYKOLOGICZNA WYBRANYCH BOJOWYCH
ŚRODKÓW TRUJĄCYCH W STOSUNKU DO SKORUPIAKÓW
*DAPHNIA MAGNA***

**ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF SELECTED CHEMICAL
WARFARE AGENTS TOWARDS CRUSTACEAN *DAPHNIA MAGNA***

Słowa kluczowe: soman, sarin, VX, *Daphnia magna*, Fluotox, acetylocholinoesteraza.

Keywords: soman, sarin, VX, *Daphnia magna*, Fluotox, acetylcholinesterase.

Chemical warfare agents (CWA) are chemical substances designated to kill, injury and incapacitate humans in military operations.

*One of the most toxic groups of CWA are organophosphates (so called nerve agents) like tabun, sarin, soman, cyclosarin and VX. Main toxic mode of action of organophosphates is blocking an enzyme acetylcholinesterase (AChE), that leads to accumulation of acetylcholine in synaptic clefts. This paper presents results of ecotoxicological tests with selected CWA towards crustacean *Daphnia magna*. Harmful effects were measured based on daphnids immobilization, AChE and β -galactosidase inhibition. The most toxic of all tested substances was VX ($EC_{50-t} - 0,59$ ng/l and $0,29$ ng/l respectively after 24hrs and 48 hrs). Concentrations that caused 50% immobilization of bioindicators were 2 orders of magnitude higher for soman (respectively $92,9$ ng/l i $59,7$ ng/l) and for sarin 3 orders of magnitude higher – $680,7$ ng/l i $161,2$ ng/l. Concentrations of CWA causing 50 % inhibition of AChE were on similar level like EC_{50-48h} obtained in immobilization test and reached values $30,8$ ng/l, $69,0$ ng/l i $0,33$ ng/l respectively for soman, sarin and VX. $EC_{50-15\ min}$ from FLUOTOX tests indicates potential part of other than AChE hydrolase enzymes in organophosphates mode of toxic action in aquatic invertebrates.*

* Dr inż. Radosław Kalinowski, mgr Edyta Chrzanowska, dr inż. Marek Brytan – Zakład Farmakologii i Toksykologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa; tel.: 22 681-61-52; e-mail: rkalinowski@wihe.waw.pl

1. WPROWADZENIE

Zgodnie z definicją NATO bojowe środki trujące (BST) są substancjami chemicznymi przeznaczonymi do użycia w operacjach wojskowych w celu uśmiercenia, poważnego uszkodzenia ciała lub obezwładnienia ludzi. Wyłączone z tej definicji są środki do tłumienia rozruchów, dymy i środki zapalające. Fosforoorganiczne BST, zwane środkami paralityczno-drgawkowymi (ang. nerve agents) są grupą szczególnie toksycznych związków – ich przykładami są m.in. tabun, sarin, soman, cyklosarin oraz VX. Pod względem budowy chemicznej są to organiczne estry kwasu fosforowego, fosfonowego i tiofosfonowego. Fosforoorganiczne BST to bezbarwne ciecze, bardzo dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, dobrze rozpuszczalne w tłuszczach oraz umiarkowanie rozpuszczalne w wodzie, w której powoli hydroлизują. Silne zasady i związki chlorujące powodują szybki rozkład BST. Lotność BST jest na ogół niewielka (zbliżona do lotności wody), ale zwykle wystarczająca do wytworzenia w powietrzu stężenia par wielokrotnie przewyższającego stężenie letalne dla człowieka i zwierząt doświadczalnych [Seńczuk 2005, Sidell i in. 1997].

Reaktywność związków fosforoorganicznych jest związana z elektrofilowym charakterem estrowego wiązania fosforu. Główny mechanizm toksycznego działania tych substancji to blokowanie aktywności enzymu acetylocholinoesterazy (AChE) i gromadzenie acetylocholiny w przestrzeniach międzysynaptycznych. Hamowanie aktywności AChE polega na kowalencyjnym wiązaniu się atomu fosforu należącego do inhibitora z centrum estera-zowym enzymu, a następnie fosforylacji znajdującej się tam grupy hydroksylowej seryny. Związki fosforoorganiczne są ogólnie uważane za substancje łatwo biodegradowalne i niekumulujące się w organizmach żywych [Manahan 2010].

Ze względu na bardzo dużą toksyczność ostrą substancji z grupy fosforoorganicznych BST, stałe zagrożenie terrorystyczne i wynikającą z niego potencjalną możliwość uwolnienia tych substancji do środowiska, a tym samym skażenia ekosystemów wodnych, oraz ograniczoną liczbę doniesień literaturowych, dotyczących ekologicznych aspektów użycia broni chemicznej, za cel niniejszej pracy postawiono określenie ekotoksyczności wybranych fosforoorganicznych BST w stosunku do skorupiaków *Daphnia magna*.

2. METODYKA BADAŃ

Badane związki

W badaniach zastosowano wybrane fosforoorganiczne bojowe środki trujące:

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

wytworzone przez Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii (Warszawa), o czystości > 99%.

Roztwory podstawowe związków przygotowano w izopropanolu. Użyte w doświadczeniu stężenie rozpuszczalnika nie wywoływało widocznych efektów u badanych organizmów. Do badań użyto szeregu stężeń w zakresie 7,8–1000 ng/l (soman i sarin) oraz 0,08–9 ng/l (VX), zwiększających się w postępie geometrycznym o ilorazie $q = 2$. Wszystkie badania wykonano w 3 powtórzeniach, a prezentowane wyniki są średnią arytmetyczną z powtórzeń.

Organizmy testowe

Do badań użyto neonaty (< 24 h) skorupiaków *Daphnia magna Strauss*, pochodzące z hodowli własnej Pracowni Ekotoksykologii Zakładu Farmakologii i Toksykologii WIHiE. Hodowla organizmów odbywa się w sposób ciągły, w warunkach oświetlenia 2500 luksów (12:12 dzień:noc), w temperaturze 20–22°C. Jako pokarm są stosowane hodowle glonów *Chlorella vulgaris*.

Test immobilizacji

Test immobilizacji wykonano zgodnie z metodyką OECD 202 [OECD 2004]. Liczbę unieruchomionych osobników określano po 24 i 48 godzinach trwania testu.

Test FLUOTOX

Test Fluotox przeprowadzono zgodnie z metodyką Jansena [Janssen i in. 1993, Espiritu i in. 1995, Łebkowska i in. 2004]. Neonaty skorupiaków ekspozowano przez 15 minut na działanie badanych związków, następnie do prób wprowadzano fluorometryczny biomarker 4-metyloumbelliferylo- β -D-galaktozydu. Pobór tego związku i jego enzymatyczna hydroliza powoduje powstanie 4-metyloumbelliferonu, dającego silną fluorescencję w świetle UV. Inhibicję enzymu galaktozydazy określono na podstawie liczby osobników niewykazujących świecenia.

Oznaczenie białka

Zawartość białka w organizmach określono metodą Lowrego wg metodyki Kłyszajko [Kłyszajko-Stefanowicz 2005]. Żywe organizmy po 48-godzinnej ekspozycji na działanie badanych związków osuszano bibułą, ważono, a następnie homogenizowano w 1,5 ml buforu fosforanowego pH = 8,0, przez 90 sekund w sonifikatorze ultradźwiękowym przy natężeniu 10 mW. Próby po sonifikacji natychmiast mrożono w temperaturze -80°C i przechowywano do późniejszej analizy.

Oznaczenie acetylocholinoesterazy

Inhibicję AChE oceniano na podstawie reakcji Ellmana [Ellman i in. 1961]. Do homogenatów skorupiaków dodawano 0,1mM DTNB i 0,1mM jodek acetylotiocholiny, po czym przez 4 minuty mierzono absorbancję przy $\lambda = 412$ nm. Inhibicję AChE odniesiono do zawartości białka w homogenacie.

3. WYNIKI

Spośród badanych BST największą toksyczność wykazywał związek VX (EC50-t – 0,59 ng/l i 0,29 ng/l odpowiednio po 24 i 48 godzinach trwania testu). Wartości stężeń somanu powodujące 50% immobilizację bioindykatorów były o 2 rzędy wielkości większe (odpowiednio 92,9 ng/l i 59,7 ng/l), zaś sarinu – o 3 rzędy wielkości większe – 680,7 ng/l i 161,2 ng/l (tab. 1).

Tabela 1. Wartości stężeń EC50-t oraz NOEC-t i LOEC-t uzyskane w teście immobilizacji

Table 1. EC50-t, NOEC-t and LOEC-t values obtained in acute immobilisation test

Związek	EC50-t (95% przedział ufności) ng/l		LOEC-48h ng/l	NOEC-48h ng/l
	24 h	48 h		
Soman	92,9 (74,6–111,2)	59,7 (46,7–72,7)	31,3	15,6
Sarin	680,7 (656,9–704,5)	161,2 (154,5–167,9)	15,6	7,8
VX	0,59 (0,54–0,64)	0,29 (0,1–0,39)	0,14	0,08

Stężenia badanych fosforoorganicznych BST powodujące 50% inhibicję enzymu acetylocholinoesterazy po 48 godzinach narażenia (tab. 2) były na poziomie zbliżonym do wartości EC50-48h uzyskanych w teście immobilizacji i wynosiły 30,8 ng/l, 69,0 ng/l i 0,33 ng/l odpowiednio dla somanu, sarinu i VX. Wartości stężeń EC50-15min uzyskane w teście Fluotox (tab. 2) wskazują na potencjalny udział innych niż AChE enzymów z grupy hydrolaz w mechanizmie toksycznego działania związków fosforoorganicznych u bezkręgowców wodnych – np. enzymów rozkładających cukry.

Tabela 2. Wartości stężeń efektywnych uzyskane w testach enzymatycznych po 15-minutowym (β -galaktozydaza) i 48-godzinnym (AChE) narażeniu na oddziaływanie BST

Table 2. Values of effective concentrations obtained in enzymatic tests, after 15 min (β -galactosidase) and 48 hrs exposure to CWA

Związek	EC50-t (95% przedział ufności) ng/l	
	β -galaktozydaza 15 min	AChE 48 h
Soman	218,1 (198–238,2)	30,8 (27,7–33,9)
Sarin	1703 (1611–1795)	69,0 (55,8–82,2)
VX	0,08 (0,06–0,10)	0,33 (0,26–0,40)

4. DYSKUSJA

W światowej literaturze jest stosunkowo niewiele doniesień na temat oddziaływania fosforoorganicznych BST na organizmy ekosystemów wodnych. Uzyskane wyniki można porównać z informacjami dotyczącymi ekotoksyczności zbliżonej chemicznie grupy substancji – insektycydów fosforoorganicznych.

Skorupiaki *Daphnia magna* wykorzystano do wstępnej oceny toksyczności i efektywności reaktywatorów AChE stosowanych u ludzi w leczeniu zatruc związkami fosforoorganicznymi zarówno z grupy insektycydów jak i BST [Vesela i in. 2006b, 2008a, 2008b]. Użyto ich również jako bioindykatorów skażenia wody BST w zautomatyzowanym, polowym systemie wczesnego ostrzegania *Daphnia Toximeter* [Green i in. 2003]. Celem testów była kontrola szybkości reakcji układu pomiarowego na zadane stężenia poszczególnych związków fosforoorganicznych w wodzie pitnej. Na podstawie badań przeprowadzonych z zastosowaniem sarinu, somanu, tabunu i cyklosarinu autorzy wykazali że 50% immobilizacja organizmów następuje przy stężeniach 10 µg/l, 6,6 µg/l, 35,5 µg/l i 60 µg/l, po czasie odpowiednio 120, 270, 65 i 52 minut.

Lum i in [2003] wskazują, podobnie jak wyniki niniejszej pracy, na największą toksyczność związku VX spośród przebadanych BST. W badaniach nad efektami działania chiralnych i achiralnych analogów somanu, sarinu i VX na słodkowodnego parzydełkowca – *Hydra attenuata* wykazali, że wartości minimalnych stężeń efektywnych po 92 godzinach ekspozycji analogów VX były o 2 rzędy wielkości mniejsze niż sarinu i o 4 rzędy wielkości mniejsze niż somanu. Autorzy zwracają również uwagę na silną, dodatnią korelację między miarą hydrofobowości badanych substancji (współczynnik podziału oktanol-woda) a obserwowanymi efektami toksycznymi. Potwierdza to hipotezę o łatwiejszym i szybszym przenikaniu substancji lipofilnych do układu nerwowego.

Burton i in. [2002] ocenili ekotoksyczność jednego z produktów przejściowych (a zarazem produktu degradacji) stosowanego do wytwarzania sarinu – metylofosfonianu diizopropylowego (DIMP – CAS: 1445-75-6). Określona przez tych autorów wartość stężenia letalnego LC50-48h dla *Ceriodaphnia dubia*, wynosząca 610 mg/l była blisko 3-krotnie mniejsza niż LC50-48h dla *Daphnia magna* uzyskana przez Bentleya i in. [1976].

Na szybkie zwiększanie się w czasie efektów toksycznego oddziaływania bojowych środków trujących wskazują badania Vesela i in. [2006a]. Wartości stężeń efektywnych tabunu dla rozwielitek zmniejszyły się 4-krotnie po wydłużeniu czasu ekspozycji z 15 do 60 minut – odpowiednio: 85 i 21,9 µg/l. Stosując model ekstrapolacyjny podany przez autorów można oszacować wartości stężeń EC50 tabunu dla *Daphnia magna* na 8,6 i 8,2 µg/l odpowiednio po 24 i 48 godzinach ekspozycji.

Sanchez-Fortun i Barahona [2009] wskazują na silną zależność między wiekiem organizmów a efektem toksycznym wywoływanym przez nieodwracalne inhibitory AChE. W badaniach nad ekotoksycznością DFP (CAS: 55-91-4, wysoko toksyczny insektycyd fosfo-

roorganiczny, używany w okresie I wojny światowej jako środek paralityczno-drgawkowy) w stosunku do słonowodnych skorupiaków *Artemia salina* stwierdzili oni blisko 500-krotne zmniejszenie wartości LC50-24h dla organizmów z klasy wiekowej 72 h w porównaniu z klasą 24 h (odpowiednio 117 $\mu\text{mol/l}$ i 0,27 $\mu\text{mol/l}$).

Barata i in. [2001], w badaniach nad toksycznością parationu (CAS: 56-38-2), stwierdzili duże zróżnicowanie w aktywności właściwej niespecyficznych i specyficznych esteraz u różnych pod względem genetycznym klonów *D. magna* – zarówno hodowanych w laboratorium, jak i pozyskanych z naturalnych zbiorników wodnych. Całkowita aktywność esteraz wynosiła od 14,9 do 62,3 U/mg białka. Autorzy Ci stwierdzili ponadto, że udział AChE w całkowitej ilości esteraz był różny u różnych klonów i wynosił od 94 do 99,1%. Najmniejszy był u organizmów pobranych ze środowiska. Ta niejednorodność w aparacie enzymatycznym bioindykatorów powodowała rozrzut wartości EC50-48h między klonami *Daphnia magna* – wynosiły one od 430 do 3050 ng/l. Autorzy stwierdzili również nieco mniejsze wartości EC50-48h dla samców niż dla samic pochodzących z tych samych zbiorowisk, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Na udział innych β -esteraz w mechanizmie toksycznego oddziaływania związków fosforoorganicznych i karbaminianów u rozwielitek wskazują także inne badania tego zespołu [Barata i in. 2004]. W przypadku insektycydów fosforoorganicznych (chlorpyrifos – CAS: 2921-88-2 i malation – CAS: 121-75-5) inhibicja karboksyloesterazy była nawet czulszym punktem końcowym niż inhibicja acetylocholinoesterazy. Uzyskane wartości stężeń IC50-48h wynosiły w przypadku karboksyloesterazy 1,0 i 6,5 nM, a AChE – 1,2 i 12,6 nM, odpowiednio dla malationu i chlorpyrifosu. W przypadku karbofuranu (CAS: 1563-66-2) stężenia inhibicyjne AChE były mniejsze niż karboksyloesterazy (odpowiednio 516,6 i 896,3 nM).

Duquesne i Kuster [2010] zwracają uwagę na inne niż unieruchomienie efekty obserwowane u skorupiaków *Daphnia magna*, narażonych na działanie małych stężeń insektycydu fosforoorganicznego – paraoksonu metylowego (CAS: 950-35-6). Autorzy Ci stwierdzili ponad 70% inhibicję AChE po 24 godzinach ekspozycji neonatów na stężenia insektycydu wynoszące ≥ 1000 ng/l. Badania lokomotoryczne wykazały, że stężenia ≥ 700 ng/l powodowały statystycznie istotne zwiększenie średniej prędkości pływania w porównaniu z próbą kontrolną. Stężenie paraoksonu metylowego wynoszące 1500 ng/l spowodowało około 40% zmniejszenie szybkości konsumpcji pokarmu, a tym samym aktywności filtracyjnej skorupiaków. Badacze zauważają również istotne ograniczenie rozmiarów rozwielitek po 6 dniach od 24-godzinnej ekspozycji na insektycyd.

Hanazato [1999] w artykule przeglądowym, dotyczącym wpływu czynników antropogennych na komunikację w zbiorowiskach planktonowych przedstawił dane dotyczące innych subletalnych efektów działania małych stężeń insektycydów u rozwielitek. Krótka, 10-godzinna, ekspozycja ciężarnych samic na stężenie karbarylu (CAS: 63-25-2, insektycyd z grupy karbaminianów, odwracalny inhibitor AChE) spowodowała wykształcenie u młodocianych samic drugiego stadium rozwojowego charakterystycznych dla samców wypo-

stek i kolców w części głowowej oraz wyraźne wydłużenie części ogonowej, podobnie jak po narażeniu na substancje zakłócające układ hormonalny (EDC – ang. endocrine disrupting chemicals). Autor zauważa również, że równoczesna ekspozycja skorupiaków na insektycydy i kariomony powoduje potęgowanie negatywnego efektu inhibitorów AChE.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na istnienie silnej, dodatniej korelacji między efektami toksycznymi, wyrażanymi jako stężenia powodujące 50% inhibicję poszczególnych enzymów oraz standardowym testem immobilizacji *Daphnia magna* (tab. 3).

Tabela 3. Współczynniki korelacji liniowej między wartościami stężeń EC50-t uzyskanymi w stosunku do różnych punktów końcowych testu

Table 3. Linear correlation coefficients between different endpoints EC50-t's

Miara efektu toksycznego	Współczynniki korelacji R ²			
	EC50-24h	EC50-48h	EC50-15min β-galaktozydaza	EC50-48h AChE
EC50-24h	1	-	-	-
EC50-48h	0,940	1	-	-
EC50 β-galaktozydaza	0,999	0,936	1	-
EC50 - AChE	0,893	0,993	0,888	1

Na istnienie dużej korelacji wyników uzyskiwanych w teście Fluotox z wynikami 48-godzinnego testu immobilizacji wskazuje także Załęska-Radziwiłł [2000], przy czym stosowanie szybkich testów enzymatycznych powinno mieć raczej zastosowanie w badaniach skринingowych [Załęska-Radziwiłł, 2000].

Jemec i in. [2007] w badaniach nad wpływem diazinonu (CAS: 333-41-5), kadmu (Cd⁺³) oraz chromu (Cr⁺⁶) na AChE i S-transferazę glutationową (GST), wykazali, że stosowanie subletalnych, enzymatycznych punktów końcowych w teście z *Daphnia magna* może mieć uzasadnienie jedynie w przypadku dokładnej znajomości mechanizmu toksycznego oddziaływania substancji chemicznych. W przypadku stężenia chromu powodującego ok. 20% immobilizację skorupiaków (280 µg/l) autorzy nie stwierdzili żadnych widocznych zmian w aktywności AChE i GST. Stężenie kadmu wynoszące ok. 20 µg/l powodowało 50% wzrost aktywności AChE. W przypadku insektycydu fosforoorganicznego stężenie powodujące blisko 30% immobilizację nie spowodowało statystycznie istotnych zmian w aktywności enzymów. Brak obserwowanych zmian aktywności AChE autorzy tłumaczą możliwością metabolizmu diazinonu przez *Daphnia magna*.

Printes i Callaghan [2004] wykazali, że w przypadku niektórych insektycydów fosforoorganicznych (acefat, CAS: 30560-19-1) zmniejszona nawet o 70% aktywność AChE nie ma wpływu na immobilizację rozwielitek, jednak w przypadku większości przebadanych insektycydów fosforoorganicznych autorzy ci stwierdzili silną korelację między inhibicją AChE a immobilizacją skorupiaków.

Sanderson i in. [2007] wykorzystali zalecane przez UE modele QSAR do wyznaczenia wartości stężeń efektywnych dla ryb, skorupiaków i glonów 22 różnych BST i 27 znanych produktów ich abiotycznego rozkładu. Przedstawione przez tych autorów wartości są 6–7 rzędów wielkości większe niż uzyskane w niniejszej pracy. Wskazuje to wyraźnie na konieczność opracowania bardziej dokładnych zależności regresyjnych dla poszczególnych klas substancji chemicznych, ponieważ używanie ich w obecnej postaci może prowadzić do ogromnych błędów, polegających zarówno na niedoszacowaniu, jak i przeszacowaniu ryzyka powodowanego przez związki chemiczne w środowisku naturalnym. Dlatego zasadne wydaje się ciągle uzupełnianie istniejących baz danych o wyniki testów toksyczności zarówno dla istniejących, jak i nowo syntetyzowanych substancji chemicznych.

5. WNIOSKI

1. Toksyczność bojowych środków trujących w stosunku do skorupiaków *Daphnia magna* jest bardzo duża i zróżnicowana. Największą toksyczność w teście immobilizacji wykazywał związek VX. Wartości stężeń somanu powodujących 50% immobilizację bioindykatorów były większe o 2 rzędy wielkości, zaś sarinu – o 3 rzędy wielkości.
2. Stężenia badanych BST, powodujące 50% inhibicję enzymu acetylocholinoesterazy po 48-godzinym narażeniu, były na poziomie zbliżonym do wartości EC50-48h uzyskanych w teście immobilizacji.
3. Wartości stężeń EC50-15min uzyskane w teście Fluotox wskazują na potencjalny udział innych niż AChE enzymów z grupy hydrolaz w mechanizmie toksycznego działania związków fosforoorganicznych u bezkręgowców wodnych – np. enzymów rozkładających cukry.
4. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na istnienie silnej, dodatniej korelacji między efektami toksycznymi wyrażanymi jako stężenia powodujące 50% inhibicję poszczególnych enzymów oraz standardowym testem immobilizacji *Daphnia magna*. Wskazuje to na możliwość użycia w przesiewowych badaniach związków fosforoorganicznych testów krótszych niż 48-godzinne.

PIŚMIENICTWO

- BARATA C., BAIRD D.J., SOARES A.M.V.M., GUILHERMINO L. 2001. Biochemical Factors Contributing to Response Variation among Resistant and Sensitive Clones of *Daphnia magna* Straus Exposed to Ethyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49(2): 155–163.
- BARATA C., SOLAYAN A., PORTE C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus, (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 66(2): 125–139.

- BENTLEY R. E., LEBLANC G. A., HOLLISTER T. A., SLEIGHT B. H. 1976. III. Acute Toxicity of Diisopropyl methyl Phosphonate and Dicyclopentadiene to Aquatic Organisms. EG and G Bionomics. MA. Wareham: 107.
- BURTON D. T., TURLEY S. D., SHEDD T. R BURROWS E. P. 2002. Toxicity of Diisopropyl Methylphosphonate (DIMP) to Aquatic Organisms. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 68(2): 282–289.
- DUQUESNE S., KÜSTER E. 2010. Biochemical, metabolic, and behavioral responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. Ecotoxicology and Environmental Safety 73(3): 353–359.
- ELLMAN L. G., COURTNEY K. D., ANDRES V., FEATHERSTONE R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology (7): 88–95.
- ESPIRITU E. Q., JANSEN C. R., PERSOONE G. 1995. Cyst-based toxicity tests VII. Evaluation of the 1 hour enzymatic inhibition test (Fluotox) with *Artemia nauplii*. Environmental Toxicology and Water Quality 10(1): 25–34.
- GREEN U., KREMER J. H., ZILLMER M., MOLDAENKE C. 2003. Detection of chemical threat agents in drinking water by an early warning real-time biomonitor. Environmental Toxicology 18(6): 368–374.
- HANAZATO T. 1999. Anthropogenic chemicals (insecticides) disturb natural organic chemical communication in the plankton community. Environmental Pollution 105(1): 137–142.
- JANSSEN C. R., ESPIRITU E. Q., PERSOONE G. 1993. Evaluation of the new “Enzymatic Inhibition” criterion for rapid toxicity testing with *Daphnia magna*. In: A. M. V. M. Soares, P. Calow (eds.) Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. Lewis Publishers, Boca Raton: 71–80.
- JEMEC A., DROBNE D., TIŠLER T., TREBŠE P., ROŠ M., SEPČIĆ K. 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 144(4): 303–309.
- KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. 2005. Ćwiczenia z biochemii. PWN, Warszawa.
- LUM K. T., HUEBNER H. J., PHILLIPS Y. LI. NT. D., RAUSHEL F. M. 2003. Organophosphate nerve agent toxicity in *Hydra attenuate*. Chemical Research in Toxicology 16: 953–957.
- ŁEBKOWSKA M., ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ M., SŁOMCZYŃSKA B. 2004. Toksykologia środowiska – ćwiczenia laboratoryjne. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- MANAHAN S. E. 2010. Toksykologia środowiska. PWN, Warszawa.
- OECD 2004. *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test and Reproduction. Test No 202.
- PRINTES L. B., CALLAGHAN A. 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. Environmental Toxicology and Chemistry 23(5): 1241–1247.

- SÁNCHEZ-FORTÚN S., BARAHONA M.V. 2009. Toxicity and characterization of cholinesterase-inhibition induced by diisopropyl fluorophosphate in *Artemia salina* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3): 775–780.
- SANDERSON H., FAUSER P., THOMSEN M., SØRENSEN P.B. 2007. PBT screening profile of chemical warfare agents (CWAs). *Journal of Hazardous Materials* 148(1–2): 210–215.
- SEŃCZUK W. 2005. Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- SIDELL F. R., TAKAFUJI E. T., FRANZ D. R. 1997. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Textbook of Military Medicine, Washington.
- VESELA S., KUCA K., JUNA D. 2006a. Toxicity of the nerve agent tabun to *Daphnia magna*, a new experimental species in military toxicology. *Chemistry and Ecology* 22(2): 175–180.
- VESELA S., KUCA K., JUNA D. 2008a. Efficacy and dosing of antidotes applied to *Daphnia* intoxicated by nerve agent tabun. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (26): 283–289.
- VESELA S., KUCA K., JUNA D. 2008b. *Daphnia* intoxicated by nerve agent tabun can be treated using human antidotes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (25): 329–333.
- VESELA S., ONDRUSKA V., KUCA K., PATOCKA J. 2006b. Tests with *Daphnia magna*: A new approach to prescreen toxicity of newly synthesized acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 21(4): 427–432.
- ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ M. 2000. Toxicity assessment of chemicals using conventional acute *D. magna* tests, Toxkits and Fluotox microbiotests. *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York: 273–277.