JAES
AÇEH

Journal of Anatolian Environmental&Animal Sciences
Year: 1, No: 3, 2016 (96-99)

Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi
Yıl: 1, Sayı:3, 2016 (96-99)

Research Paper / Araştırma Makalesi

Akut Toksisite Testi Hassasiyetinin Belirlenmesinde Referans Toksik Madde Olarak Formaldehit Kullanımı

Vildan Zülal SÖNMEZ[1*2], Nüket SİVRİ[1]

[1]İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34320, İstanbul
[2]Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 81620, Düzce

Öz: *Hızlı toksisite testlerinden; test süresi, numune hacmi, uygun maliyeti ve sonuç hassasiyeti nedeniyle; biyolüminesans bakteri ile yapılan akut toksisite testi, birçok ülke standartlarında yerini almıştır. Biyolüminesans bakterinin ticari bir kiti olan Microtox® Reagent'ın hassasiyeti, referans toksik madde (kontrol) sayesinde tespit edilebilmektedir. Microtox® akut toksisite testinde kullanılmak üzere üretici firma tarafından farklı referans toksik maddeler (kontrol) önerilmektedir. Bu çalışmada, Microtox® akut toksisite testinde kullanılmak üzere formaldehitin alternatif referans toksik madde (kontrol) olarak kullanımı hedeflenmiştir. Formaldehitin Vibrio fischeri'ye göre olan akut toksisitesi, 5., 15. ve 30. dakika inhibisyon sürelerinde çalışılmıştır. İnhibisyon sürelerine göre EC_{50} değerleri sırasıyla 2,30±0,60 mg/l; 2,14±0,63 mg/l ve 2,17±0,70 mg/l bulunmuştur. Her bir örnekleme grubu için bulunan EC_{50} değerlerinin, ortalamadan sapmaları ise 0,01-0.47 arasında değişim göstermiştir. Formaldehitin tüm inhibisyon süreleri için ortalama akut toksisite sonucuna bakıldığında da; 5. dakikalık sonuçta 0,10 birim sapma görülmektedir. 15. ve 30. dakikalık inhibisyon süreleri için ise; ortalama sırasıyla 0,06 ve 0,04 birim sapma ile ortalamaya ve birbirlerine daha yakın değerler aldığı tespit edilmiştir. Çalışılan referans toksik maddeler; reagent, analizör ve test operatörünün pipetleme hassasiyetinin performansını göstermektedir.*

Anahtar Kelimeler: *Akut toksisite, Vibrio fischeri, Microtox®, referans toksik madde, formaldehit.*

Interlaboratory precision of acute toxicity tests using reference toxicant formaldehyde

Abstract: *Acute toxicity test, which takes place among rapid toxicity tests and is conducted through bioluminescent bacteria, has been included in many countries' standards thanks to its test duration, sample volume, cost-efficiency and result sensitivity. Sensitivity of Microtox® Reagent, being one of the commercial kits of bioluminescent bacteria, can be detected via reference toxicant (control). Various reference toxicants (control) are recommended by the manufacturer company to be used in Microtox® acute toxicity test. This study aims to use formaldehyde as alternative reference toxicant (control) in Microtox® acute toxicity test. Acute toxicity of formaldehyde, according to Vibrio fischeri, was investigated on 5., 15. and 30. minutes of inhibition periods. EC_{50} values were found as 2,30±0,60 mg/l; 2,14±0,63 mg/l and 2,17±0,70 mg/l by inhibition periods, respectively. Standard deviation of EC_{50} values found for each sample group differed between 0,01-0,47. According to mean acute toxicity results of all formaldehyde inhibition periods, 0,10 unit deviation was found in 5. minutes of results. For 15. and 30. minutes of inhibition periods, mean value of unit deviation was found as 0,06 and 0,04 which showed closer values to each other and the mean value. The investigated toxicants show the performance of pipetting sensitivity of reagent, analyzer and test operator.*

Keywords: *Acute toxicity, Vibrio fischeri, Microtox®, reference toxicant, formaldehyde.*

GİRİŞ

Toksikolojik testlerde, ekolojik olarak güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek için sadece uygun test tipinin değil aynı zamanda uygun test organizmasının da seçilmesi gerekmektedir (Rand, 1995). Özellikle atıksuların örnek alımından test organizmasının seçimine kadar, farklı laboratuvar tasarımları ve kurallar dizisi mevcuttur. Akut toksisite testleri genel olarak 20 test organizmasından herhangi birinin, beş farklı atık konsantrasyonunun ve bir kontrol suyunun her birine maruz bırakılmasını içermektedir ki, genellikle test süresi 24 ila 96 saat arasında değişmektedir (EPA, 2002). Her bir atık su kompozisyonuna veya kimyasal içeriğe göre uygun metod ve tür tespiti, testin doğruluğunda anahtar rol üstlenmektedir. Örneğin; bir kimyasalın ve onun yan ürün/kalıntılarının veya birkaç kimyasalla etkileşim halinde bulunan kompleks toksik atıksuların, biyolojik etkilerini ölçmek gibi analizi zor olan durumlarda biyoindikatör türlerin kullanımı tercih edilmektedir. Bu anlamda, biyoindikatör türler erken uyarı belirteç türleri olarak hedeflenmektedir. Erken uyarı belirteçleri; çevresel değişikliklere daha hızlı ve hassas tepki vererek bireysel veya suborganizmal (biyobelirteç) seviyelerinde ölçüm fırsatı vermektedir (Gerhardt, 2002).

Toksikolojik olarak sıcak noktaların (hot spots) belirlenmesinde, atıksularda toksisite belirleme ve giderme veya zamana bağlı değişimlerin toksisite açısından saptanmasında toksisite testleri kullanılmaktadır. Ayrıca, kimyasalların tek başına ya da kompleks halde toksisitenin belirlenmesinde hızlı ve standart testler tercih edilmektedir (Toussaint ve ark., 1995; Sponza, 2002; van der Grinten ve ark., 2010). Hızlı toksisite testlerinden; test süresi, numune hacmi, uygun maliyeti ve sonuç hassasiyeti nedeniyle; biyolüminesans bakteri ile yapılan Microtox® akut toksisite testi, özellikle Avrupa'daki ülkelerde popüler hale gelmiştir (Ma ve ark., 2014).

Biyolüminesans bakterinin ticari kiti olan Microtox® Reagent'ın hassasiyeti, referans toksik madde (kontrol) sayesinde kolayca tespit edilebilmektedir. Ayrıca, bakterinin (*Vibrio fischeri*) canlılığından emin olabilmek ve operatörün pipetleme hassasiyetini değerlendirmek için de, referans toksik madde kullanılmaktadır. Test validasyonu için kullanılan pozitif kontroller toksik maddeyi belirli bir referans noktası olarak almaktadır. Taşıyıcı solventler gibi kullanılan negatif kontroller de bakterinin doz-cevap ilişkisini belirleme ve testin hatalı okumalarını minimize etmek için tercih edilmektedir. Microtox® akut toksisite testinde kullanılan hem negatif hem de pozitif kontroller, bakteriler tarafından ışık yayılımındaki doğal değişikliklerin izlenmesinde önem arz etmektedir (Blaise ve Férard, 2005).

İyi bir akuatik toksikoloji laboratuvarında, uygulamalarda referans madde (kontrol) seçilirken; kimyasalın saflığı, kararlılığı, yaygın olarak kullanılabilirliği, çözünürlüğü, doz-cevap ilişkisi, iş sağlığı ve güvenliği çerçevesinde operatörün durumunun göz önünde bulundurulması

gerekmektedir. Microtox® akut toksisite testinde kullanılmak üzere üretici firma tarafından yıllarca ticari olarak satılan bir ürün olan Listerine® tercih edilmiştir. Zamanla organik referans toksik madde olarak fenol, inorganik referans toksik madde olarak çinko sülfat ($ZnSO_4$) önerilmiştir (Blaise ve Férssard, 2005). Fenol için ortalama etkili konsantrasyon (EC_{50}) 5. dakika EC_{50} değerleri tipik olarak 13-26 mg/L aralığında iken, $ZnSO_4$ için 15. dakika değerleri 3,0 ve 10 mg/L arasında değişmektedir (Microtox® Manual, 1992). Ayrıca yapılan çalışmalarda, Microtox® akut toksisite testi uygulamalarında farklı referans toksik maddeler (kontrol) kullanılmıştır. Birçok çalışmada; pozitif kontrol olarak *fenol* (Johnson ve Long, 1998; Liu ve ark., 2001) ve *$ZnSO_4$* (Harkey ve Young, 2000) taşıyıcı solventlerin kullanıldığı çalışmalarda ise; negatif kontrol olarak daha çok *DMSO* (Harkey ve Young, 2000) tercih edilmiştir. Bunun yanı sıra; non-toksik (toksik olmayan) referans madde (kontrol) olarak *glikoz* kullanılan çalışmalar da mevcuttur (García-Montaño ve ark., 2008).

Bu çalışmada, Microtox® akut toksisite testinde, referans toksik madde (kontrol) olarak formaldehit'in alternatif kullanım olanağının ve böylece laboratuvar çalışmalarında akut toksisite testi hassasiyetinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Microtox® akut toksisite testinde formaldehit'in, *Vibrio fischeri*'ye göre olan akut toksisitesi, 5., 15. ve 30. dakika inhibisyon sürelerinde farklı tekrarlarla çalışılmış ve sonuçlar EC_{50} değeri ile sunulmuştur.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, alternatif referans toksik madde (kontrol) olarak, toksik olduğu bilinen (LD_{50} oral: LD_{50} Rat 592 mg/kg) ve ticari saflıkta temin edilen CH_2O (%37'lik formaldehit solüsyonu, Merck, CAS No: 1.04002.1000) kullanılmıştır. Toksik olduğu üretici firmalar tarafından vurgulanan formaldehit; birbirinden farklı sektörlerde, (tarım, tıp, kozmetik, mobilya ve yapı vb.) yaygın olarak kullanılmaktadır (URL, 2016). Günümüz laboratuvarlarında ise organizma bütünlüğünü korumaya/saklamaya yönelik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Özellikle endüstriyel alanda kullanımı yaygın olan formaldehit, endüstriyel atık suların kompozisyonunda da yer alabilmektedir. Ayrıca, farklı akut toksisite testlerini kıyaslamasında yararlanılan kimyasallar arasında formaldehit, sahip olduğu özelliklerinden dolayı ilk sıralarda bulunmaktadır (Guilhermino ve ark., 2000).

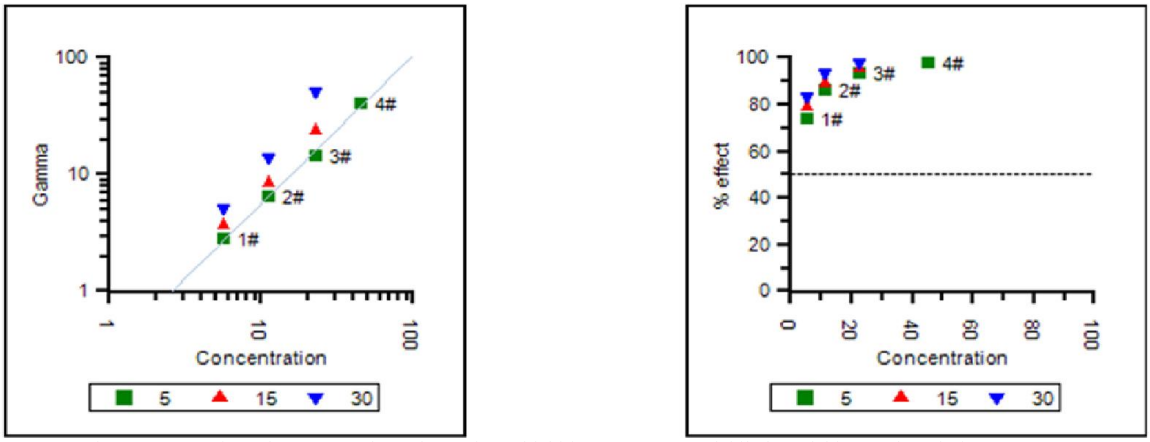
Microtox® akut toksisite testinde, denizel biyolüminesans bakteri olan *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177)'ye göre akut toksisite tespiti, ilgili testin üretici protokolüne göre yapılmıştır (Microtox® Manual, 1992). Bu prosedüre göre, %45 Basic Test seçilmiş olup; 10 µl bakteri kültürü %2'lik NaCl içeren numunelere maruz bırakılmıştır. Metot gereği, biyolüminesans bakterinin toksik madde ile karşılaştıktan sonraki ışık çıkışı ile numune içermeyen kontrolün (şahit-%2'lik NaCl) ışık çıkışı kıyaslanarak ölçüm yapılmaktadır. Şahit olarak %2'lik NaCl kullanılmış olup; test 2 seri tekrar halinde yürütülmüştür. Şahit ve numunenin ışık çıkışı arasındaki fark, numunenin organizma üzerindeki etkisine dayanmaktadır (Microtox® Manual, 1992).

Bu akut toksisite testinde, *Vibrio fischeri*'ye olan formaldehitin toksisitesi, 5., 15. ve 30. dakikalık maruz kalma sürelerinde çalışılmıştır. Organizmanın tepkisini etkilememesi açısından, organizmanın maruz kaldığı sıcaklık, ölçüm zamanı süresince cihaz tarafından otomatik olarak ayarlanmaktadır. Microtox® Omni yazılımı sayesinde kaydedilen değerler, yine bu yazılım sayesinde sonuçlar EC_{50} değeri olarak sunulmuştur.

BULGULAR

Microtox® akut toksisite testinde, *Vibrio fischeri*'ye göre akut toksisite tespitinde formaldehit ile yürütülen çalışmada, belirlenen başlama konsantrasyonu olarak 2,5 ml çalışılmıştır. Ancak "*Basic Test*"e göre, çalışılan bu hacimde cihazda okuma yapılamamıştır. Bunun üzerine farklı konsantrasyonların çalışılması hedeflenmiş ve okuma yapılabilen konsantrasyon tespiti için seyreltmeler çalışılmıştır. Buna göre, 2 µl formaldehit ile son hacim 2,5 ml olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

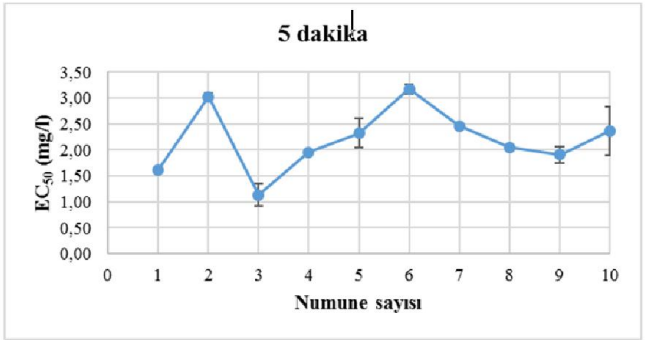
Okunan değerler Microtox® Omni yazılımı sayesinde EC_{50} değeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 1). Formaldehitin biyolüminesans bakterinin inhibisyon sürelerine göre EC_{50} değerleri ise mg/l cinsinden Tablo 1'de sunulmuştur. Değerler irdelendiğinde, 5., 15. ve 30. dakikalardaki inhibisyon sürelerine göre EC_{50} değerleri sırasıyla 2,30±0,60 mg/l, 2,14±0,63 mg/l ve 2,17±0,70 mg/l olarak bulunmuştur. Her bir örnekleme grubu için bulunan farklı inhibisyon sürelerindeki (5., 15. ve 30. dakika) EC_{50} değerlerinin, ortalamadan sapmaları ise 0,01-0,47 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2, 3, 4)



Şekil 1: Microtox® Omni yazılımına göre hesaplanan formaldehitin 5., 15. ve 30. dakikalarındaki EC_{50} değerleri.

Tablo 1. Formaldehitin Microtox® akut toksisite testi sonuçları.

Kimyasal madde	EC_{50}(mg/l)		
Formaldehit (n=10)	***5. dk.***	***15. dk.***	***30. dk.***
	1,61	1,73	1,51
	3,09	2,83	3,15
	1,35	0,99	1,06
	1,93	2,02	1,93
	2,60	2,17	2,20
	3,08	3,09	3,35
	2,41	2,49	2,48
	2,03	1,82	2,29
	2,07	1,64	2,01
	2,84	2,59	1,68
Formaldehit ort.	2,30±0,60	2,14±0,63	2,17±0,70



Şekil 2. Her bir örnekleme grubu için bulunan EC_{50} – 5. dakika değerlerinin ortalamadan sapmaları.

Şekil 3. Her bir örnekleme grubu için bulunan EC_{50} – 15. dakika değerlerinin ortalamadan sapmaları.

Şekil 4. Her bir örnekleme grubu için bulunan EC_{50} – 30. dakika değerlerinin ortalamadan sapmaları.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Microtox® akut toksisite testinde, referans toksik madde (kontrol) olarak formaldehitin alternatif kullanım olanakları ve teste ilişkin yüksek hassasiyet, elde edilen sonuçlara göre belirlenmiştir. Buna göre; formaldehitin pozitif referans toksik madde olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Formaldehitin tüm inhibisyon süreleri için ortalama akut toksisite sonucuna bakıldığında; 5. dakikalık grupta 0,10 birim sapma, 15. ve 30. dakikalık gruplarda ise inhibisyon süreleri için; sırasıyla 0,06 ve 0,04 birim sapma ile ortalama üzerinden değerlendirildiğinde, birbirlerine istatistiksel olarak önemli yakınlıkta değerler aldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Microtox® akut toksisite testi ile yapılan *Vibrio fischeri*'nin ışıma yapabileceği seyreltmede çalışmak da yeterli olmuştur. Formaldehitin uçucu yapısından dolayı standart akut toksisite testlerinde 24 saatlik maruziyet doğru sonucu yansıtamamaktadır. Kimyasalın yapısından dolayı, bu toksisite testinde 5. - 30. dakikalar arasında elde edilen sonuçlar deneyin doğruluk payını arttırmaktadır. Ayrıca, standart toksisite testlerine kıyasla, daha az seyreltilmiş numune sayesinde *Vibrio fischeri* ile hassas sonuçların alınabilmesine de olanak sağlanmaktadır.

Microtox® akut toksisite testinde, maruz kalma zamanı ve test sıcaklığı toksisiteye etki etmektedir. Vasseur ve ark. (1986)'ne göre; inhibisyon süresi arttıkça Microtox®'un hassasiyeti de artmaktadır. Farklı araştırmacılar tarafından da farklı maruz kalma süreleri ile çalışılmış olup; tek bir inhibisyon süresi sonucunun üzerinden toksisite yorumlanmıştır (Loibner ve ark., 2004; Rigol ve ark., 2004; Parvez ve ark., 2006; Pazdzior ve ark., 2016). Microtox® M500 analizöründe, akut toksisite testi için 5. ve 15. dakika otomatik olarak cihaz tarafından tanımlanıyorken; 3. zaman seçimi tercihi operatöre bırakılmıştır. Ancak sadece 5 dakikalık inhibisyon süresinin sonundaki akut toksisite sonucu, özellikle organik içeriği yüksek numuneler için yanıltıcı olabilmektedir. Bu sebeple, numunenin akut toksisitesi hakkında genel bir fikir verme adına (var/yok) toksisite tarama testi sonucu olarak kullanılabilir. 15 dakikalık inhibisyon süresi sonucu ise; tüm organik ve inorganik fraksiyonlardaki toksik maddelerin toksisitesini yansıtacağından daha çok tercih edilmektedir. Bu çalışmada da, formaldehitin akut toksisite sonucuna bakıldığında da; 15 ve 30 dakikalık inhibisyon sürelerinin birbirine daha yakın değerler aldığı görülmektedir. Farklı inhibisyon sürelerinde elde edilen sonuçlar, çalışılan zamanın önemli olduğunu ve toksisite sonucunu etkilediğini ortaya çıkarmaktadır

Bu çalışmada, çalışılan diğer referans toksik maddelerin; reagent, analizör ve test operatörünün pipetleme hassasiyetinin performansını gösterdiği hipotezi ile formaldehitin referans olarak kullanım olanakları hedeflenmiştir. Ayrıca diğer testlere göre, bu toksisite testinde operatörden kaynaklanabilecek tek ve en büyük hata pipetlemedir. Laboratuvar çalışmalarında hassas sonuçların alınmasında uygulama ve kurallar esas alındığından, formaldehitin kullanım olanakları üzerinden hassasiyet değerlendirmesi önemli bir ayrıcalıktır. Özellikle, çalışılacak olan numuneye, belirlenen hacimden daha fazla ya da daha az miktarda bakteri kültürünün eklenmesi bakteri ışımasının ölçümünde hataya neden olmaktadır. Bazı durumlarda, bu hatadan dolayı, cihazda okuma yapılamamaktadır.

Sucul ekosistemlerde ve özellikle kıyısal alanlarda toksik etkilerin belirlenmesinde, uygulanacak akut toksisite testinde aranan temel parametreler zaman ve hassas (doğru) ölçümün yapılabilmesidir. Akut toksisite değerlerinin kısa sürede ve hassas ölçüm sonuçları ile elde edilmesinde, uygulanacak test ve metodoloji seçimi uzmanlık gerektirmektedir. Türkiye'de eksikliği hissedilen toksisite çalışmaları ve metodoloji geliştirme araştırmalarının yaygınlaşması; elde edilen sonuçların yayınlanarak paylaşılması bu konuda yaptırımların da uygulanmasında temel teşkil edecektir.

KAYNAKLAR

Blaise C. and Férard JF., (2005). Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Springer Netherlands.

EPA., (2002). U.S Environmental Protection Agency, Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 5. Edition, Washington.

García-Montaño J., Domenech X., García-Hortal JA., Torrades F. and Peral J., (2008). The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal, *Journal of Hazardous Materials*, **154**(1), 484-490.

Gerhardt A., (2002). *Bioindicator species and their use in biomonitoring*, Environmental Monitoring I, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Oxford: Eolss Publishers.

Guilhermino L., Diamantino T., Silva MC. and Soares AMVM., (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safe*ty, **46** (3), 357-362.

Harkey GA. and Young TM., (2000). Effect of soil contaminant extraction method in determining toxicity using the Microtox® assay. *Environmental toxicology and chemistry*, **19** (2), 276-282.

Johnson BT. and Long ER., (1998). Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem in vitro testing approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17** (6), 1099-1106.

Liu MC., Chen CM., Cheng HY., Chen HY., Su YC., and Hung TY., (2002). Toxicity of different industrial effluents in Taiwan: a comparison of the sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox®. *Environmental toxicology*, **17** (2), 93-97.

Loibner AP., Szolar OHJ., Braun R. and Hirmann D., (2004). Toxicity testing of 16 priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Lumistox. *Environ Toxicol Chem*., **31** (3), 557-564.

Ma XY., Wang XC., Ngo HH., Guo W., Wu MN. and Wang N., (2014). Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Science of the Total Environment*, **468**, 1-11.

Microtox® Manual, (1992). Microbics Corporation, Carlsbad, USA.

Parvez S., Venkataraman C. and Mukherji S., (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International*, **32** (2), 265-268.

Paździor K., Wrębiak J., Klepacz-Smółka A., Gmurek M., Bilińska L., Kos L., Sójka-Ledakowicz J. and Ledakowicz S., (2016). Influence of ozonation and biodegradation on toxicity of industrial textile wastewater, *Journal of Environmental Management,* (in press).

Rand GM., (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment, CRC Press.

Rigol A., Latorre A., Lacorte S. and Barcelo, D., (2004). Bioluminescence inhibition assays for toxicity screening of wood extractives and biocides in paper mill process water, *Environ Toxicol Chem*., **23** (2), 339-347.

Sponza DT., (2002). Incorporation of toxicity tests into the Turkish industrial discharge monitoring systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **43**(2), 186-197.

Toussaint MW., Shedd TR., van der Schalie WH. and Leather GR., (1995). A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14** (5), 907-915.

URL., (2016). http://www.formaldehit.net/formaldehit-kullanim-alanlari.html. Ziyaret tarihi: 02.12.2016/15:16.

van der Grinten E., Pikkemaat MG., van den Brandhof EJ., Stroomberg GJ. and Kraak MH., (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics, *Chemosphere*, **80** (1), 1-6.

Vasseur P., Bois F., Ferard JF. and Rast C., (1986). Influence of physicochemical parameters on the Microtox® test response. *Toxicity Assessment*, **1** (3), 283-300.

Geliş tarihi: 13.12.2016
Kabul tarihi: 22.12.2016

***Başlıca Yazar Yazışma adresi:**
Arş. Gör. Vildan Zülal Sönmez
İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi
Çevre Mühendisliği Bölümü, İSTANBUL, 34320, Türkiye.
E-mail: zulal.kiremitci@istanbul.edu.tr