



**METODYKA OZNACZANIA ŚLADÓW MATERIAŁÓW WYBUCHOWYCH
ORAZ ICH POCHODNYCH W ZŁOŻONYCH MATRYCACH
NA PRZYKŁADZIE WYKORZYSTANIA BIOWSKAŹNIKA AKUMULACJI**

***METHODOLOGY FOR IDENTIFICATION OF TRACES OF EXPLOSIVE
MATERIALS AND THEIR DERIVATIVES IN COMPLEX MATRIXES
ILLUSTRATED BY ACCUMULATION BIOMARKERS***

Piotr A. BARAN *baranp@witu.mil.pl*, ORCID: 0000-0002-4309-1278

Izabela MAZUR, Piotr KASPRZAK, Damian MODZELEWSKI

Wojskowy Instytut Techniczny Uzbrojenia, ul. Prymasa Stefana Wyszyńskiego 7
05-220 Zielonka

Military Institute of Armament Technology, 7 Wyszyńskiego St., 05-220 Zielonka

Mariusz TSZYDEL, Dagmara BŁOŃSKA

Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

*The Chair of Ecology and Zoology of Invertebrates, the Faculty of Biology and Environment
Protection at the Lodz's University, 12 Banacha St., 16 90-237 Lodz*

DOI 10.5604/01.3001.0053.7232

Streszczenie: W XXI wieku, różne wydarzenia polityczne i społeczne powodują pojawianie się nowych zagrożeń związanych z produkcją, przechowywaniem i użyciem środków bojowych zawierających kruszące materiały wybuchowe. Zanieczyszczenia stanowią wyzwanie dla specjalistycznych laboratoriów, które zajmują się ich wykrywaniem i identyfikowaniem źródła pochodzenia. Niestety, tego typu zanieczyszczenia mają poważny wpływ na ludzkie zdrowie powodując m.in. poważne uszkodzenia układów i narządów człowieka, a także długotrwałe skutki zdrowotne, takie jak choroby nowotworowe i inne poważne zaburzenia zdrowia. Dlatego ważne jest, aby zwrócić uwagę na te zagrożenia i zrobić wszystko, co w naszej mocy, aby zapobiegać ich pojawianiu się i zminimalizować ich szkodliwe skutki. W badaniach ekosystemów częstym problemem jest niskie stężenie badanej substancji, które jest poniżej limitu detekcji urządzenia. W takich przypadkach biowskaźniki kumulacji okazują się być bardzo pomocne. Biomarkery są doskonałym narzędziem do wykrywania zanieczyszczeń w wodzie płynącej i w glebie.

Abstract: Different political and social events of the 21st century have been bringing about the appearance of new threats connected with production, storing and using of combat assets containing the high explosive materials. The contaminations are challenging for specialised laboratories dealing with their detection and identification of sources of origin. Unfortunately, such contaminations have a serious influence into the human health causing for instance significant injuries of human systems and organs, and long term problems with the health such as cancer diseases and other serious health disturbances. Therefore, it is important to focus attention on these threats, and to do everything possible to prevent their appearance and minimise the harmful effects. A low concentration of tested agent, below the instrument detection threshold, is a frequent problem at investigations of ecosystems. In such cases biomarkers of cumulation prove to be very helpful. Biomarkers can be a perfect tool for detection of contaminations in the flowing water and in the ground. They can be used to establish the

Dzięki nim można stwierdzić obecność określonych czynników chemicznych, a jednocześnie są one czułym wskaźnikiem reakcji ekosystemu na skażenie. W oparciu o chromatografię cieczową została opracowana uniwersalna metoda, która umożliwia analizę trotylu i jego pochodnych w wytypowanym przez nas biowskaźniku akumulacji – larwach chruścików z gatunku *Hydropsyche angustipennis*, Curtis 1834 oraz próbkach gleby, czy innych złożonych matrycach. Metoda chromatograficzna pozwala na ilościowe i jakościowe oznaczenie różnych pochodnych trotylu, takich jak 2,6-diamino-4-nitrotoluen, 2,4-dia-mino-6-nitrotoluen, 1,3,5-trinitrobenzen, trójnitrotoluen, 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen i tetrylu w złożonej matrycy biologicznej. Dodatkowo przeprowadzono badanie efektu kumulacji trotylu w tkance larw chruścików poddanych ekspozycji w rozworach testowych zawierających trotyl przez 1 do 24 godzin. Zauważono efekt wysycenia oraz zmierzono stężenie pochodnych trotylu. Zaobserwowane efekty potwierdziły użyteczność wytypowanej larwy jako biowskaźnika akumulacji zanieczyszczeń trotylu w ekosystemie.

Słowa kluczowe: trotyl, zanieczyszczenie, biowskaźnik, akumulacja, ślady, chromatografia, HPLC

1. Wstęp

Analiza śladów zanieczyszczeń jest jednym z ważnych aspektów współczesnej nauki o środowisku. Znajomość rozmiaru i zasięgu zanieczyszczeń chemicznych jest niezbędną do podejmowania skutecznych działań mających na celu poprawę stanu środowiska. W tym kontekście, poszukiwanie śladów materiałów wybuchowych i ich wpływu na organizm ludzki jest równie ważne, szczególnie w świetle zagrożeń związanych z produkcją, przechowywaniem i użyciem środków bojowych zawierających kruszące materiały wybuchowe. Analiza środowiska jest interdyscyplinarną dziedziną łączącą chemię analityczną, nauki biologiczne i geologiczne. Aby ją wykonywać trzeba znać nie tylko proces analityczny, ale także naturę środowiska, w którym występują zanieczyszczenia chemiczne. Metody anali-

presence of specific chemical agents and at the same time they are a sensitive indicator of ecosystem's reaction to the contamination. A universal method was developed basing on the liquid chromatography for analysis of trotyl and its derivatives present in larvae of caddisflies from species of *Hydropsyche angustipennis*, Curtis 1834, and in the samples of soil, or in other complex matrixes. The chromatographic method can label quantitatively and qualitatively different derivatives of trotyl, such as 2,6-diamino-4-nitrotoluene, 2,4-dia-mino-6-nitrotoluene, 1,3,5-trinitrobenzen, trinitrotoluene, 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen, and tetryl in a complex biologic matrix. Additionally, an effect was investigated of trotyl cumulation within 1 to 24 hours in the tissue of caddisfly larvae subjected to exposition of tested solutions contained trotyl. An effect of saturation was noticed and the concentration of trotyl derivatives was measured. Observed effects confirmed the usefulness of chosen larvae as a bioindicator of trotyl contamination accumulation in ecosystem.

Keywords: trotyl, contamination, biomarker, accumulation, traces, chromatography, HPLC

1. Introduction

Analysis of contamination traces is one of important aspects of contemporary environment science. The knowledge on extension and range of chemical contaminations is indispensable for taking effective actions aimed to improve environmental conditions. In this context a search for traces of explosive materials and their influence into the human organism is equally important, especially in the light of threats connected with the manufacture, storing, and using of combat assets containing the high explosive materials. The analysis of environment is an interdisciplinary domain combining the analytical chemistry, and biological and geological sciences. It can be performed when not only an analytical process is known, but the nature of environment where the chemical contami-

tyczne można podzielić na dwie grupy. Pierwsza zawiera proste metody używane do codziennego monitorowania typowych zanieczyszczeń, takich jak woda, ścieki, gleba i atmosfera, a druga zawiera złożone metody używane do pomiaru wybranych, ale ważnych zanieczyszczeń, które nie są wymienione w przepisach prawnych. Obie grupy metod są ważne dla poznania stanu i jakości środowiska i powinny być traktowane jako integralna część analizy środowiskowej, wykorzystywanej m.in. do monitorowania środowiska.

W badaniach ekosystemów częstym problemem jest niskie stężenie badanej substancji, które jest poniżej limitu detekcji urządzenia. W takich przypadkach biowskaźniki kumulacji okazują się być bardzo pomocne. Biomarkery są doskonałym narzędziem do wykrywania zanieczyszczeń w wodzie płynącej i w glebie. Dzięki nim można stwierdzić obecność określonych czynników chemicznych, a jednocześnie są czułym wskaźnikiem reakcji ekosystemu na skażenie.

Biomarkery materiałów wybuchowych stanowią ważny aspekt w badaniach środowiska, służąc do identyfikacji i monitorowania śladów zanieczyszczeń. Wiele różnych roślin i zwierząt może być używanych jako biowskaźniki, w zależności od konkretnego rodzaju zanieczyszczenia. W pracy skupiono się na najbardziej znanym kruszącym materiale wybuchowym – trotylu.

Trójnitrotoluen (trotyl, TNT) to kruszący materiał wybuchowy, który dzięki stosunkowo prostej i ekonomicznej produkcji oraz stabilności, możliwości topienia, odlewania i formowania na gorąco w skorupy, ma szerokie zastosowanie zarówno w działaniach wojskowych (napełnianie korpusów pocisków, min, a także innych elementów bojowych amunicji) oraz cywilnych (do produkcji cywilnych środków strzałowych, takich jak pobudzacze czy ładunki burzące) na całym świecie. Badania

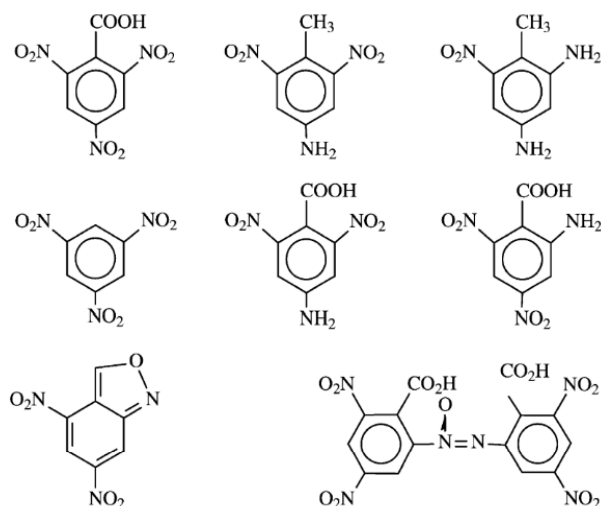
are present, as well. Analytical methods may be divided on two groups. The first comprises some simple methods used for everyday monitoring of typical contaminations, such as water, sewage, soil, and atmosphere, and the second the complex methods for measurement of selected, but important contaminations, which are not specified in legal regulations. Both groups of methods are essential to recognise the status and quality of environment, and have to be treated as an integral part of environmental analysis used above all for the monitoring of environment.

A low concentration of tested substance below the instrument detection limit is a usual problem in investigations of ecosystems. In such cases the biomarkers of cumulation can be helpful. Biomarkers can be a perfect tool for detection of contamination in flowing water and soil. They can be used to evidence the presence of specific chemical agents and at the same time they are a sensitive indicator of ecosystem's reaction to the contamination.

Biomarkers of explosive materials create an important aspect of environmental investigations and are used to identify and monitor the traces of contaminations. There are many various plants and animals which can be used as the biomarkers depending on particular type of contamination. The paper is focused on trotyl which is the most known type of the high explosive material.

Trinitrotoluene (trotyl, TNT) is the high explosive material which due to relatively simple and inexpensive production, and stability, meltability, mouldability, and ability of hot forming into the shells has a wide application both for military operations (filling the bodies of projectiles, mines, and other parts of munitions), and civilian (for production of civilian shots such as detonators, or demolition shots) all over the world. Investigations over the presence of trotyl in

obecności trotylu w środowisku [1] wykazały reakcje fotolityczne i reakcje utleniania-redukcji, które prowadzą do wytworzenia różnych produktów rozpadu przedstawionych na rys. 1.



the environment [1] have discovered the photolytic reactions and the oxidation-reduction reactions leading to creation of different products of decomposition presented in Fig. 1.

Rys. 1. Pochodne trotylu – produkty degradacji[4]

Fig. 1. TNT derivatives - degradation products[4]

Podczas produkcji, przechowywania i stosowania materiałów wybuchowych, takich jak trotyl, może nastąpić zawodowe lub przypadkowe narażenie na te związki poprzez spożycie, wdychanie lub przez skórę [2-6]. Oddziaływanie na organizm ludzki, w zależności od czasu ekspozycji, powoduje różne efekty: uszkodzenie wątroby, niedokrwistość, podrażnienie błon śluzowych, nerek, bóle mięśni, leukocytozę lub leukopenię, a także nieprawidłowości pracy serca [7-10]. Głównymi metabolitami trotylu w moczu są 4-amino-2,6-dinitrotoluen i 2-amino-4,6-dinitrotoluen¹, natomiast u osób narażonych na działanie trotylu tworzą się addukty hemoglobiny z aminodinitrotoluenów [8].

During the manufacture, storing, and using of explosive materials such as trotyl an occupational or accidental exposition to these compounds can happen by the consumption, breathing, or through the skin [2-6]. Their action into human body triggers different effects depending on the time of exposition: injury of liver, leukaemia, irritation of mucus membranes, kidneys, pains of muscles, leucocytosis or leukopenia, and irregularities of heart operation [7-10]. The main metabolites of trotyl in urine are 4-amino-2,6-dinitrotoluen and 2-amino-4,6-dinitrotoluen², and persons exposed to trotyl can be affected by creation of adducts of haemoglobin from aminodinitrotoluene [8].

¹ Większość badań wskazuje, że wydalanie z moczem amino-dinitrotoluenów (4-amino-dinitrotoluen plus 2-amino-dinitrotoluen) w zakresie od 1 do 10 mg L(-1) (5-50 mikroM) nie jest rzadkością - na przykład u osób zatrudnionych przy usuwaniu odpadów wojskowych. Trinitrotoluen jest mutagenny w niektórych szczepach *Salmonella typhimurium*, z i bez egzogennej aktywacji metabolicznej. Aktywność mutagenną stwierdzono w moczu pracowników, którzy byli zawodowo narażeni na działanie TNT.

² Most of analyses show that the excretion of amino-dinitrotoluene (4-amino-dinitrotoluene plus 2-amino-dinitrotoluene) together with urine in then range from 1 to 10 mg L(-1) (5-50 microM) is not a rare case – for instance by persons employed at removal of military waste. Trinitrotoluene is mutagenic in some variants of *Salmonella typhimurium*, with and without exogenic metabolic activation. The mutagenic activity was stated in the urine of workers who were professionally exposed to TNT.

Skażenie gleby i wody przez materiały wybuchowe może być również związane z niewłaściwymi praktykami usuwania odpadów w trakcie produkcji, podczas działań demilitaryzacyjnych, szkoleń wojskowych, niewybuchami na polu walki oraz technikami usuwania w procesach produkcyjnych, w których niedoczyszczone ścieki odprowadzane są do np. do strumieni. Zwykle zanieczyszczenie wód gruntowych silnie zależy od opadów atmosferycznych oraz od rozpuszczalności i kinetyki rozpuszczania związku chemicznego stanowiącego zanieczyszczenie [10]. Trotyl pochodzący z zakładów produkujących amunicję, składów materiałów wybuchowych i amunicji oraz obiektów demilitaryzowanych zapewne przedostaje się i nadal może przedostawać się do środowiska glebowego i wodnego [11], co obecnie stanowi problem globalny narażenia ludzi, roślin oraz zwierząt na zanieczyszczenia środowiskowe trotylem i jego pochodnymi. Zrozumienie toksykologicznych skutków oddziaływania materiałów wybuchowych na środowisko przyrodnicze jest niezwykle ważne, a w obliczu różnych konfliktów zbrojnych na świecie niezbędne jest opracowanie sposobu wykrywania śladów tych związków w ekosystemie oraz ich wpływu na zdrowie człowieka.

Aby to osiągnąć, potrzebne jest zidentyfikowanie organizmów, które mogą być bio-skaźnikami oraz opracowanie odpowiedniej metody detekcji tego typu zanieczyszczeń. Idealna metoda analizy próbek pobranych z potencjalnie skażonych miejsc powinna być prosta w użyciu i wykorzystywać standardowy sprzęt laboratoryjny, być wystarczająco odporna, tak aby drobne odchylenia od standardowej procedury nie wpływały znacząco na rzetelność wyników i zapewniać zdolność wykrywania na poziomie lub poniżej kryteriów ustanowionych w celu ochrony zdrowia ludzkiego i środowiska. Metoda powinna także za-

Contamination of soil and water by explosive materials may be also connected with improper practices at removal of production waste, and with actions of demilitarisation, military training, and with unexploded ordnance left on the battlefields, and with techniques of removal in technological processes where unclean sewages are directed, for instance, to the streams. Usually, the contamination of ground waters strongly depends on atmospheric precipitations and on the solubility and the kinetics of solving for the chemical agent constituting the contamination [10]. Trotyl originating from the plants manufacturing the ammunition, depots of explosive materials and ammunition, and demilitarised objects, migrates to the soil and water environment [11] what is now a global problem threatening the population, vegetation, and animals by trotyl and its derivatives. The understanding of toxicological effects on natural environment caused by explosive materials is crucial, and development of a method for detection of traces of these agents in the ecosystem and of an impact into the human health is needed in the face of different conflicts in the world.

For this reason it is necessary to identify the organisms which can be used as biomarkers, and to develop a suitable method for detection of such contaminations. A perfect method for analysis of samples taken from potentially contaminated places has to be simple in handling, and has to use standard laboratory equipment, and has to be sufficiently resistant against minor deviations from the standard procedure to prevent their significant influence into the accuracy of results, and to provide the capacities of detection on the level, or below, the criteria established for protection of human health and environment. At the same time, the method has also provide the marking of common

pewniać jednoczesne oznaczanie powszechnych wtórnych materiałów wybuchowych, ich zanieczyszczeń produkcyjnych i produktów przemiany środowiskowej.

2. Dotychczasowe badania

Dostępne publikacje opisują badania toksyczności trotylu dla bezkręgowców wodnych [13, 14, 15], dla płazów [12] i ryb [2, 13] w ekosystemach wodnych w celu przeprowadzenia oceny ryzyka oraz ustalenia remediacji³ w miejscach zanieczyszczonych. W zakresie biokoncentracji i bioakumulacji trotylu w organizmach wodnych przeprowadzone zostały liczne badania np. w celu oceny potencjału biokoncentracji TNT (w bezkręgowcach dennych i owadach) i określenie znaczenia drogi narażenia pokarmowego w akumulacji TNT (u ryb) [10].

Zazwyczaj metody opracowywane są w oparciu o najgorsze przypadki narażenia, w sposób umożliwiający wykonanie szacunków w odniesieniu do ryzyka jakie stwarza akumulacja TNT i produktów jego biotransformacji w organizmach (przez przyjęcie do ustne jak i osmozę).

Podstawowa ocena wpływu badanych zanieczyszczeń na ekosystemy wodne polega najczęściej na chemicznej oraz fizycznej analizie jakości wody oraz biomonitoringu organizmów żywych w nich występujących [17]. Często jednak zdarza się, iż różne zanieczysz-

secondary explosive materials, and their production contaminations, and the products of environmental conversion.

2. Former Investigations

Available publications describe investigations of trotyl toxicity for aquatic invertebrates [13, 14, 15], for amphibians [12] and fish [2, 13] in water ecosystems in order to assess the risk and establish the remediation⁴ in the contaminated places. A few investigations were carried out on the bioconcentration and bioaccumulation of trotyl in aquatic organisms to address for instance a potential of TNT bioconcentration (in bottom invertebrates, and insects) and to identify the meaning of a digestive exposition way in the accumulation of TNT (in fish) [10].

The methods are usually developed on the basis of the worst cases of exposition and in a way securing the estimations of the risk created by the accumulation of TNT and the products of its bioconversion in organisms (both by oral acceptance and osmosis).

The basic assessment of influence the investigated contaminations have into the aqueous ecosystems is usually grounded on the chemical and physical analysis of water quality and on the biomonitoring of organisms living there [17]. But it often happens

³ Zgodnie z Dz.U.2021.0.1973 t.j. - Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. - Prawo ochrony środowiska jest to *poddanie gleby, ziemi i wód gruntowych działaniom mającym na celu usunięcie lub zmniejszenie ilości substancji powodujących ryzyko, ich kontrolowanie oraz ograniczenie rozprzestrzeniania się, tak aby teren zanieczyszczony przestał stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi lub stanu środowiska, z uwzględnieniem obecnego i, o ile to możliwe, planowanego w przyszłości sposobu użytkowania terenu; remediacja może polegać na samooczyszczaniu, jeżeli przynosi największe korzyści dla środowiska*

⁴ According to Law Monitor 2021.0.1973 i.e. – the Act from 27 April, 2001 – The right of protection of the environment concerns of *submission of soil, ground and ground waters to actions aimed to removal or reduction of amounts of substances causing the risk, and to their control and limitation of migration in such a way that the contaminated area stops to create any threat for the human health or the state of the environment, by taking into account the present and possibly future way of using the terrain; remediation may be based on self-purification if it is most beneficial to the environment.*

czenia w wodzie ulegają rozcieńczeniu, w wodach płynących ulegają przemieszczeniu i ze względu na niskie stężenie nie jest możliwe wykrycie ich metodami analitycznymi (nie przekraczają progu detekcji urządzenia). Natomiast organizm w kontakcie z zanieczyszczeniem może kumulować je w swoich tkankach. Dlatego też obecnie w ocenie zanieczyszczenia środowiska wód powierzchniowych uwaga naukowców skierowana jest na monitoring gatunków - bioindykatorów [18, 19].

Taksony, grupy organizmów, które można zdefiniować na podstawie podobieństw biologicznych, takich jak budowa ciała, sposób życia, czy pochodzenie, stosowane jako jednogatunkowe uniwersalne biowskaźniki akumulacji, wydają się być obiecującym narzędziem w ocenie zanieczyszczenia wód, nawet jeśli od bezpośredniego zanieczyszczenia minął jakiś czas. Przykłady taksonów, które często stosuje się jako biowskaźniki, to makrofitofity, makroinwazyjne bezkręgowce, ryby i skorupiaki. Wiele badań wykazało, że te grupy organizmów są wrażliwe na zanieczyszczenia wodne i szybko reagują na zmiany jakości środowiska.

3. Materiały i metody

3.1. Substancje chemiczne

Trinitrotoluen (TNT) wykorzystany podczas prowadzenia eksperymentu do stworzenia testowych warunków środowiskowych pochodził od polskiego producenta, natomiast wzorce klasy analitycznej aminowych pochodnych trotylu (najczęściej występujących w światowych danych literaturowych) t.j. 4-amino-2,6-dinitrotoluenu (4A-DNT) i 2-amino-4,6-dinitrotoluenu (2AD-NT) zakupiono w Merck Sp.z o.o., a 2,4-diamino-6-nitrotoluenu (2,4DA-NT) i 2,6-diamino-4-nitrotoluen (2,6DA-NT) z firmy LGC Standards,.

that various contaminations are diluted in water, and are displaced in the running waters, and because of a low concentration they cannot be detected by analytical methods (they do not cross the instrument detection threshold). At the same time the organism tissue may cumulate them during the contact. For this reason the scientists are focused on monitoring of species – bioindicators at the assessment of environmental contamination of surface waters [18, 19].

Taxons, the groups of organisms which can be identified on the basis of biological similarities such as the structure of body, way of life, or the origin, and used as a single-species universal bioindicators of accumulation, seems to be a promising tool for assessment of water contaminations even if some time has passed from the contamination. Macrophytophytes, macro-invasives, invertebrates, fish, and crustaceans are the examples of taxons which are often used as bioindicators. Numerous investigations have proved that these groups of organisms are sensitive to water contaminations and rapidly react to changes of the environment quality.

3. Materials and Methods

3.1. Chemical Compounds

Trinitrotoluene (TNT), employed at the leading of the experiment for creation of testing environmental conditions, originated from a Polish manufacturer, whereas the references of the analytical class of trotyl amine derivatives (most often present in the world literature data), i.e. 4-amino-2,6-dinitrotoluene (4A-DNT) and 2-amino-4,6-dinitrotoluene (2AD-NT) were purchased at Merck Sp.z o.o., and 2,4-diamino-6-nitrotoluene (2,4DA-NT) and 2,6-diamino-4-nitrotoluene (2,6DA-NT) in LGC Stand-

Wodny roztwór podstawowy trotylu (testowe warunki środowiskowe) przygotowano przez rozpuszczenie czystego trotylu z ogrzewaniem i mieszaniem przez 24 godziny, a następnie rozcieńczenie do stężenia docelowego – 5 mg/L.

3.2. Materiał biologiczny

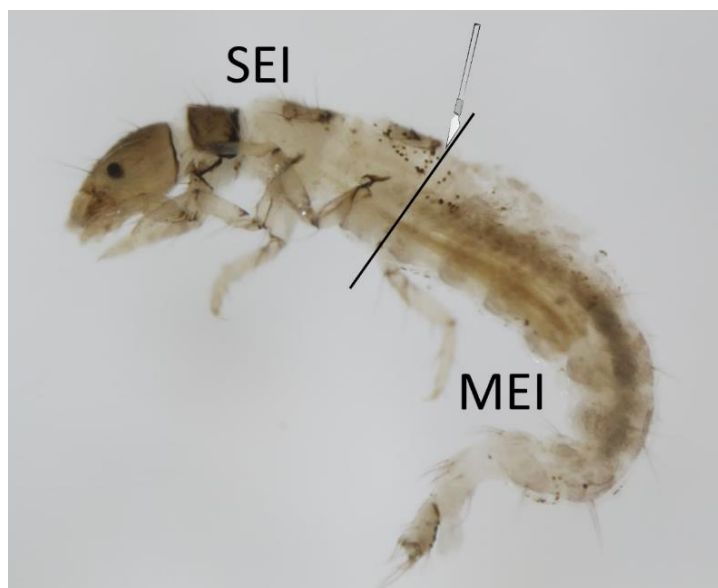
Do badań wytypowano larwy chruści-ków bezdomkowych z gatunku wodosówka potokowa (*Hydropsyche angustipennis*) w najbardziej zaawansowanym (piątym stadium) larwalnym (rys. 2) ze stanowiska na rzece Mrodze w okolicy miejscowości Bogdanka/k. Koluszek. Organizmy pozyskane ze środowiska naturalnego zostały aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych. W ladzie chłodniczej ustawiono temperaturę jednakową do tej, która panowała podczas poboru organizmów z wody. Przeprowadzono standardową aklimatyzację (3 doby), podczas której larwy wydalały strawiony pokarm. Dzięki temu rozkładające się odchody nie wpływały na przemiany/absorpcję testowanego zanieczyszczenia.

ards company.

The basic aqueous solution of trotyl (testing conditions of environment) was prepared by solving the pure trotyl at heating and stirring within 24 hours, and by dilution to final concentration – 5 mg/L.

3.2. Biological Material

The larvae of homeless caddisflies from the species of stream water bill (*Hydropsyche angustipennis*) in the most advanced (fifth) larva stage (Fig. 2) were selected for investigations and were taken from the testing site in the Mrodze river placed in vicinity of Bogdanka village, near Koluszki. The organisms acquired from the natural environment were adopted to the laboratory conditions. In the cooling chamber the temperature was set to be identical with such one existing at picking up the organisms from the water. The standard conditioning was carried out (3 days) during which the larvae excrete the digested feed. Due to it the decomposing excrements have not interfered with the conversion/absorption of tested contamination.



Rys. 2. *Hydropsyche angustipennis* (Trichoptera:Hydropsychidae) – zdjęcie wykonane przez Roberta Kowalskiego (GIOŚ Kielce, materiał biologiczny: Czarna Nida i Bobrza)

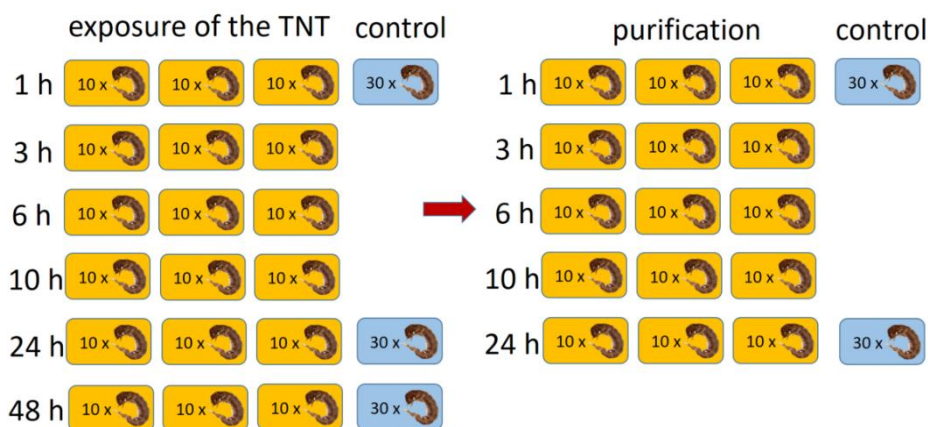
Fig. 2. *Hydropsyche angustipennis* (Trichoptera:Hydropsychidae) – pictures of Mr. Robert Kowalski (GIOŚ Kielce, biological material: Czarna Nida i Bobrza)

3.3. Warunki ekspozycji i plan eksperymentu

W celu oceny, jak zachowują się larwy badanego gatunku owadów wodnych w kontakcie z trotylem wykonano badania pilotażowe. Ustalono, że optymalnym czasem ekspozycji na tego typu zanieczyszczenie będą 2 doby, ponieważ szybka reakcja na tego typu zanieczyszczenia jest warunkiem stawianym wybranym bioindykatorom i mogły być zastosowane jako potencjalny detektor zanieczyszczenia w środowisku.

3.3. Conditions of Exposition and Scheme of Experiment

The piloting tests were performed to assess the behaviour of larvae of the investigated species of water insects contacting with trotyl. It was established that 2 days is an optimal time of exposition to such contamination as the rapid reaction is a requirement for selected bioindicators to use them as a potential detector of contamination in the environment.



Rys. 3. Plan eksperymentu oraz warunki ekspozycji larw na roztwór wzorcowy trotylu
 Fig. 3 Experimental plan and exposure conditions for the reference solution of TNT

Larwy chrzączków (długość – ok. 2 cm, masa ciała – ok. 30 mg) były przetrzymywane po 10 osobników w pojemnikach z tworzywa o pojemności 400 ml i poddane działaniu roztworu wodnego trotylu o stężeniu 5 mg/L jako środowiska testowego (rys. 3). W każdym wariancie czasowym wykonano po 3 powtórzenia. Zastosowano próbkę kontrolną, której środowisko badawcze nie zawierało odczynnika stresowego i kolejne pojemniki z próbkami skierowanymi na odpowiedni czas ekspozycji na czynnik stresowy bez odnawiania ani napowietrzania podczas ekspozycji. Każdy pojemnik był przechowywany w lodzi chłodniczej (11 ± 1 °C, w zaciemnieniu). Stworzone warunki środowiskowe (tempera-

Caddisfly larvae (length – ca. 2 cm, weight – ca. 30 mg) were kept by 10 organisms in plastic containers with capacity of 400 ml and subjected to action of trotyl water solution of concentration 5 mg/L as testing environment (Fig. 3). 3 repetitions were made for each time variant. A checking sample was applied with the testing environment without any stressing agent, and consecutive containers with samples designated for a specific time of exposure against the stressing agent without any renovation and airing during the exposure. Each container was kept in the cooling chamber (11 ± 1 °C, in dark). Created environmental conditions (temperature and limited impact of UV) were similar

tura oraz ograniczony wpływ UV) były zbliżone do panujących podczas poboru larw, co pozwoliło zmniejszyć ewentualny szok termiczny i stres badanych osobników w czasie hodowli. Szok termiczny i stres mogły spowodować odchylenie od zachowania osobniczego i wpływać na fizjologię kumulacji testowanego zanieczyszczenia.

W eksperymentach poboru (dla punktów kontrolnych $t_t=1/3/6/10/24/48$ h) ekspozycja na trotyl trwała do 48 godzin. Po 1h i 24 h pobrano również organizmy z próby kontrolnej (z czystej wody bez TNT). W eksperymentach samooczyszczania się, część larw (dla punktów kontrolnych $t_t=1/3/6/10/24$ h) poddano depuracji w wodzie destylowanej przez 24 godziny. Następnie larwy były pobierane ze środowiska testowego (ekspozycyjnego i oczyszczającego) i przechowywane w stanie zamrożonym do czasu laboratoryjnej analizy tkanek. Wszystkie 30 larw z każdego punktu kontrolnego doświadczenia zostało zebranych do analizy tkanek (nie odnotowano śmiertelności badanych organizmów podczas prowadzenia eksperymentu).

3.4. Analiza chemiczna

Wykonano roztwory wodne substancji wzorcowych 1,3,5-trinitrotoluenu, 2-amino-4,6-dinitrotoluenu, 4-amino-2,6-dinitrotoluenu, 2,4-diamino-6-nitrotoluenu i 2,6-diamino-4-nitrotoluen. W celu uzyskania jak najlepszego rozdziału wzorców przeprowadzono analizy z doбором warunków. Zamrożone larwy dla każdej próbki testowej zostały podzielone na część schitylizowaną SEI (głowa i tułów z odnóżami) i tkankę miękką MEI (odwłok). Cięcie zostało wykonane tuż za trzecim segmentem pancerza okrywającego tułów z odnóżami (rys.2). Każdą z otrzymanych grup tkanek zważono (część schityni-

to those existing at the collection of larvae what reduced possible thermal shock and stress of investigated organisms during the breeding. Thermal shock and stress could cause deviation from the organism's individual behaviour and influence on the physiology of cumulation of tested contamination.

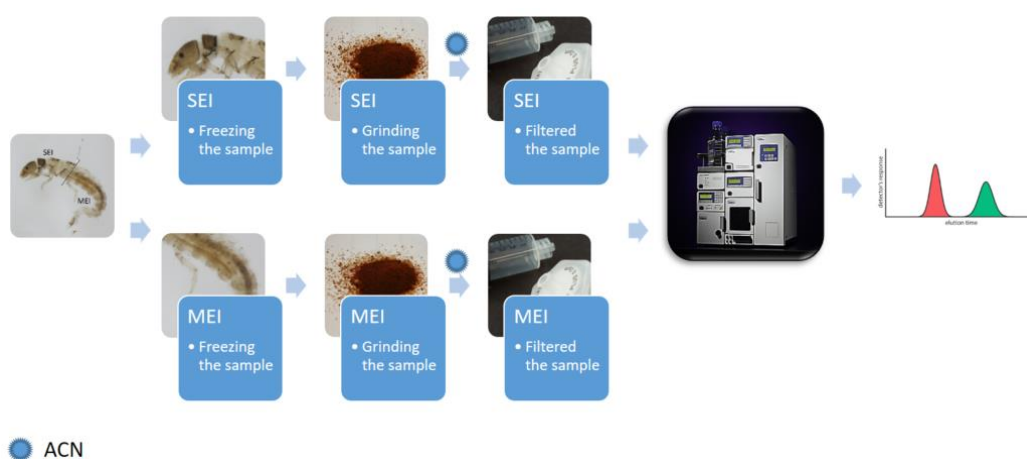
In the experiments of sampling (for testing points $t_t=1/3/6/10/24/48$ h) the exposure to trotyl lasted to 48 hours. The organisms from the checking sample (clean water without TNT) were also taken after 1h and 24 h. In the experiments of self-purification a part of larvae (for testing points $t_t=1/3/6/10/24$ h) was subjected to depuration in the distilled water within 24 hours. Next, the larvae were taken from the testing environment (exposing and purifying) and stored at frozen condition until the laboratory analyses of tissues were made. All 30 larvae from each testing point of the experiment were collected for the analysis of tissues (no cases of death were noted for investigated organisms during the conducted experiment).

3.4. Chemical Analysis

Water solutions were prepared for reference substances of 1,3,5-trinitrotoluene, 2-amino-4,6-dinitrotoluene, 4-amino-2,6-dinitrotoluene, 2,4-diamino-6-nitrotoluene and 2,6-diamino-4-nitrotoluene. In order to get a possibly best distribution of reference substances the analyses were carried out with selection of conditions. Frozen larvae of each testing sample were divided on a chitinized part SEI (head and upper body with limbs) and a soft tissue MEI (rear body). The cut was made just behind the third segment of a crust covering the torso with the limbs (Fig. 2). Each group of received tis-

zowana ~0,100 g, część miękka ~0,250 g), głęboko zamrożono, rozdrobniono mechanicznie, rozpuszczono w acetonitrylu, a następnie przefiltrowano z użyciem filtrów strzykawkowych (Nylon FilterBio® NY, 0,45 µm). Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu kolumny chromatograficznej Intersil C8 5µm 4.6 x 150 mm z fazą ruchomą 18:82 (v/v) 2-propanol:woda, metodą izokratyczną (detektor UV, 230 nm). Wykonana została również ślepa próba metody.

sues was weighted (chitinized part ~0,100 g, soft part ~0,250 g), and deeply frozen, and mechanically fragmented, and solved in acetonitrile, and next filtered through syringe filters (Nylon FilterBio® NY, 0,45 µm). The samples prepared in this way were analysed by liquid chromatography (HPLC) by using chromatographic column Intersil C8 5µm 4.6 x 150 mm with the movable phase 18:82 (v/v) 2-propanol:water, and the isocratic method (detector UV, 230 nm). A blank determination of the method was also performed.



Rys. 4. Analiza chemiczna TNT i jego pochodnych w złożonej matrycy biologicznej
Fig. 4. Chemical analysis of TNT and its derivatives in a complex biological matrix

4. Wyniki

4.1. Wchłanianie i metabolizm w czasie – przykładowe porównanie SEI i MEI (ekspozycja 1/24h)

W celu ustalenia wpływu (tłumienia) sygnałów przez matrycę biologiczną porównano zawartości trotylu i jego pochodnych zmetabolizowanych w próbkach części schitynizowanej i miękkiej organizmów dla punktów kontrolnych 1 h i 24 h (ekspozycja). Otrzymane chromatogramy (tabela 1) porównawcze dla części schitynizowanej (SEI) i części miękkiej (MEI) organizmów w punktach kontrolnych 1 h i 24 h wskazują na

4. Results

4.1. Absorption and Metabolism in Time – Exemplary Comparison of SEI and MEI (Exposition 1/24h)

In order to establish the influence (attenuation) of signals by the biological matrix the contents of trotyl and its derivatives which were metabolized in the samples of the chitinized and soft parts of organisms for testing points of 1 h and 24 h (exposition) were compared. The received comparative chromatographs (table 1) for the chitinized part (SEI) and for the soft part (MEI) of organisms at the testing points of 1 h and 24 h

wyraźnie lepsze wchłanianie trotylu przez część miękką, a także wyraźnie większy przyrost jego dwóch aminowych pochodnych (2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen), które powstają w wyniku zachodzącego procesu metabolizmu.

indicate that there is both a significantly better absorption of trotyl by the soft tissue, and a significantly greater increment of its amine derivatives (2-amino-4,6-dinitrotoluene, 4-amino-2,6-dini-trotoluene) which are created in effect of the running process of metabolism.

Tabela 1. Chromatogram porównawczy zawartości trotylu i jego pochodnych zmetabolizowanych w próbkach części schitylizowanej i miękkiej organizmów dla punktów kontrolnych 1 h i 24 h (ekspozycja)
Table 1. Comparative chromatogram of the content of TNT and its derivatives metabolized in samples of the chitinized and soft parts of the organisms for 1 h and 24 h control points (exposure)

Opis	Czas [h]	Masa [mg]	Związek chemiczny	C [mmol/g]
Część schitylizowana larwy (SIE)	1	121,0	2,4,6-TNT	< LOD
			2A-4,6DNT	
			4A-2,6DNT	
	3	81,2	2,4,6-TNT	< LOD
			2A-4,6DNT	
			4A-2,6DNT	
	6	131,5	2,4,6-TNT	9,77
			2A-4,6DNT	5,59
			4A-2,6DNT	2,73
	10	98,4	2,4,6-TNT	14,09
			2A-4,6DNT	8,72
			4A-2,6DNT	6,25
24	114,8	2,4,6-TNT	26,83	
		2A-4,6DNT	11,57	
		4A-2,6DNT	11,36	
Część miękka larwy (MEI)	1	271,9	2,4,6-TNT	6,64
			2A-4,6DNT	1,31
			4A-2,6DNT	4,22
	3	219,0	2,4,6-TNT	15,03
			2A-4,6DNT	4,49
			4A-2,6DNT	4,02
	6	286,6	2,4,6-TNT	37,12
			2A-4,6DNT	8,63
			4A-2,6DNT	6,87
	10	183,4	2,4,6-TNT	50,40
			2A-4,6DNT	8,86
			4A-2,6DNT	14,54
	24	257,4	2,4,6-TNT	90,78
			2A-4,6DNT	13,46
			4A-2,6DNT	26,27

Wynik otrzymany już dla 24-godzinnego narażenia na czynnik stresowy w porównaniu do 1-godzinnego jest zadowalający i bardzo dobrze rokujący o możliwości wykorzystania wytypowanych organizmów jako bioindykatorów.

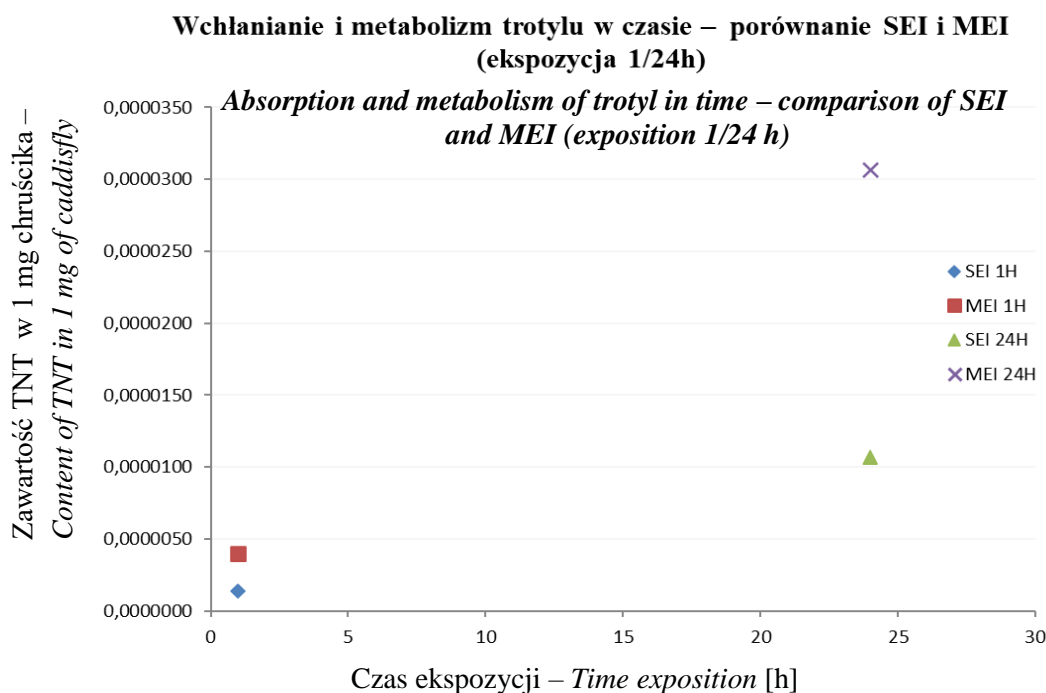
Na wykresie 1 przedstawiono porównanie graficzne oznaczonych zawartości trotylu i jego pochodnych zmetabolizowanych w próbkach

The result received for just 24-hour exposure, and compared to 1-hour, to the stressing agent is satisfactory and promising for using some chosen organisms as bioindicators.

Diagram 1 presents a graphical comparison of marked contents of trotyl and its derivatives metabolized in the samples of the

części schitynizowanej i miękkiej organizmów dla punktów kontrolnych 1 h i 24 h (ekspozycja).

chitinized and soft parts of organisms for control points 1 h and 24 h (exposition).



Wykres 1. Porównanie zawartości trotylu w próbkach części schitynizowanej i miękkiej organizmów dla punktu kontrolnego 1 h i 24 h (ekspozycja) – wyszczególnienie dla części schitynizowanej

Diagram 1. Comparison of TNT content in samples of the chitinized and soft parts of the organisms for the 1 h and 24 h control point (exposition-drainage) - detailing for the chitinized part

Zaobserwowana na wykresie 1 znaczna różnica w poziomach wartości trotylu oznaczonych dla części schitynizowanej i części miękkich wskazuje, iż część schitynizowana w mniejszym stopniu wchłania czynnik stresowy oraz analiza obarczona jest większym błędem oznaczenia zawartości poszukiwanych analitów.

Uzyskany wynik zarówno dla części miękkiej jak i schitynizowanej chrząstek świadczy o prawidłowym przebiegu metabolizmu czynnika stresowego (środowiskowego) w ich organizmach. Różnice w poziomach sygnałów pochodzących od trotylu i jego pochodnych dla części schitynizowanej w stosunku do sygnałów otrzymanych dla części miękkich potwierdza lepszą chłonność części

A significant difference between the measured levels of trotyl observed in graph 1 for chitinized and soft parts indicates that the chitinized part absorbs the stressing agent in a lower degree, and the analysis is burdened by a greater error in identification of the contents for searched analities.

The result received both for the soft and chitinized part proves that the run of stressing (environmental) agent metabolism in their organisms is correct. Differences in levels of signals produced by trotyl and its derivatives for chitinized parts against the signals received for soft parts confirm a better absorption of soft parts of organisms and a potential for their application as the bioindicators of contamination

miękkiej organizmów i potencjał zastosowania ich jako bioidentyfikatorów zanieczyszczenia środowiska wodnego trotylem.

Wyraźna różnica w zawartościach trotylu dla próbki ekspozycyjnej i oczyszczonej oraz oznaczona większa zawartość pochodnych 2-amino-4,6-dinitrotolenu i 4-amino-2,6-dinitrotolenu w częściach miękkich organizmów pozwoliła na podjęcie decyzji o istotności wyników uzyskanych właśnie dla tej części. Ważnym czynnikiem do podjęcia takiej decyzji był również fakt, iż dla części schitylizowanej zawartość analizowanych substancji dla początkowych punktów kontrolnych była poniżej limitu detekcji. Dodatkowo matryca biologiczna części schitylizowanej podnosi poziom szumów (spadek poziomu S/N) co przekłada się na zwiększenie niepewności pomiaru.

4.2. Kumulacja i metabolizm w czasie

Wyniki otrzymane podczas przeprowadzonych analiz jednoznacznie wskazują na zależność zawartości trotylu w próbce organicznej oraz jego dwóch pochodnych aminowych (2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen od czasu ekspozycji. Nie stwierdzono obecności podwójnie aminowych pochodnych trotylu.

Zaobserwowana zależność zmiany zawartości w próbce trotylu i jego dwóch pochodnych aminowych w stosunku do upływającego czasu i wchłaniania przez organizmy w kolejnych etapach pomiarowych jest prawidłowa. Zmiany te są subtelne, jednak przedstawiają się zadowalająco w przełożeniu na zależność ilości badanych związków od czasu ich ekspozycji. Omówiona zależność powstających pochodnych w trakcie ekspozycji i wchłaniania trotylu od czasu (w wybranych punktach kontrolnych) narażenia na czynnik środowiskowy (stresowy) przedstawiono w tabeli 2 i na wykresie 2.

of the water environment by trotyl.

Visible difference in the contents of trotyl for the exposed sample and the purified one, and the greater presence identified for derivatives 2-amino-4,6-dinitrotoluen and 4-amino-2,6-dinitrotoluen in the soft parts of organisms helped to decide about essentiality of results received just for this part. The fact that the content of the analysed substances for chitinized parts at initial control points was below the limit of detection was also an important argument for making such decision. Additionally, the biological matrix of the chitinized part increases the noise level (reduction of S/N level) what increases the measurement's uncertainty.

4.2. Cumulation and Metabolism Over Time

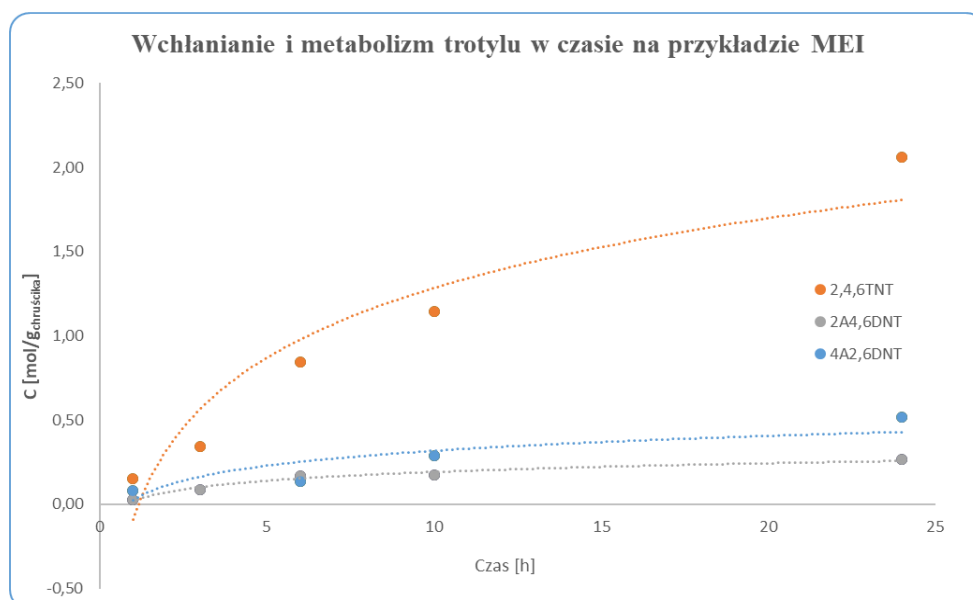
Results received during performed analyses clearly indicate that there is a dependence between the content of trotyl and its two amine derivatives (2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen) in the organic sample and the time of exposure. No presence of double aminated derivatives of trotyl was stated.

The observed dependence of the changed content of trotyl and its two amine derivatives in the sample on the running time, and on the absorption by the organisms in successive measurement stages, is correct. The changes are subtle, but they are sufficiently translated into the dependence of the amounts of investigated compounds on the time of their exposition. The presented dependence of derivatives created during the exposition, and absorption of trotyl, on the time (in chosen control points) of exposure to the environmental (stressing) agent is presented in table 2 and in diagram 2.

Tabela 2. Zależność powstających pochodnych w trakcie ekspozycji i wchłaniania trotylu dla wybranych punktów kontrolnych

Table 2. Relationship of derivatives formed during exposure and TNT absorption for selected control points

Czas [h] Time	MEI eksp. - Zawartość [mmol/g] MEI exposition – Content [mmol/g]		
	2,4,6-TNT	2A-4,6DNT	4A-2,6DNT
1	0,15	0,03	0,08
3	0,34	0,09	0,08
6	0,84	0,17	0,14
10	1,14	0,17	0,29
24	2,06	0,27	0,52

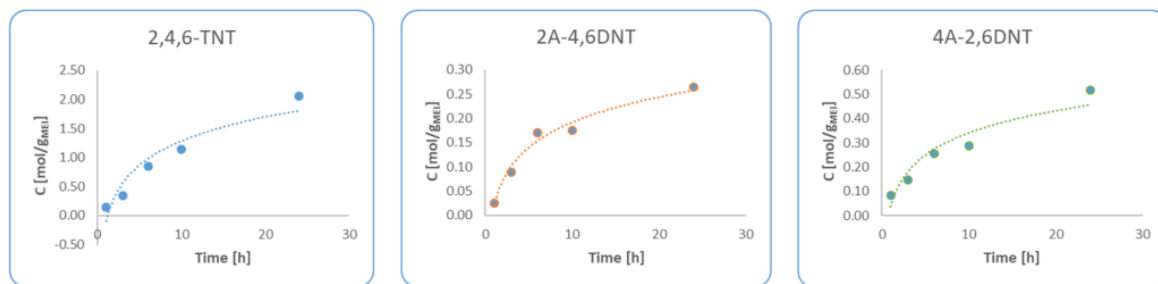


Wykres 2. Wchłanianie i metabolizm trotylu w czasie na przykładzie MEI

Diagram 2. Absorption and metabolism of TNT over time for MEI as an example

Zaobserwowano wysycanie badanych organizmów trotylem w czasie (potwierdzone wcześniejszymi badaniami pilotażowymi) oraz wyraźną zależność wzrostu zawartości w próbce dwóch aminowych pochodnych w stosunku do upływającego czasu ekspozycji na obecność trotylu w środowisku testowym w poszczególnych punktach pomiarowych.

A saturation of investigated organisms by trotyl was observed over the time (confirmed by former piloting tests) with a clear dependence of the increased content of two amine derivatives in the sample on the running time of exposition to trotyl in the testing environment for particular measurement points.



Wykres 3. Zależność pochodnych powstałych podczas ekspozycji i absorpcji trotylu dla wybranych punktów kontrolnych (MEI)

Diagram 3. Relationship of derivatives formed during exposure and TNT absorption for selected control points (MEI)

W punkcie kontrolnym $t = 24$ h, uzyskany sygnał analityczny jest wyraźny i jednoznaczny (zarówno dla trotylu jak i jego pochodnych), co dowodzi, iż reakcja badanych organizmów na zanieczyszczenie w postaci trotylu jest wystarczająco szybka, aby możliwe było użycie ich jako potencjalnego bioidentyfikatora.

4.3. Samooczyszczanie się organizmów z trotylu i jego metabolitów

Kolejną badaną grupę chrzączek stanowiły organizmy, które po ustalonym czasie ekspozycji na obecność trotylu w środowisku testowym poddano procesowi oczyszczenia. Zaobserwowano nieznaczne różnice w zawartości pozostałości trotylu dla punktów kontrolnych 1h, 3h, 6h i 10h po oczyszczeniu, natomiast dla próbki 24 h obniżenie poziomu zawartości pozostałości jest znaczne. Wyniki analiz wyraźnie wskazują, iż zawartość trotylu w organizmie poddanemu 24-godzinnej ekspozycji, a następnie oczyszczeniu⁵ jest najmniejsza, natomiast zawartość pochodnych aminowych (2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen) największa. Nie stwierdzono obecności podwójnie aminowych pochodnych trotylu.

Wynik eksperymentu wskazuje na znacz-

In the control point $t = 24$ h, the obtained analytical signal is explicit and unambiguous (both for trotyl and its derivatives), what proves that the reaction of investigated organisms to the contamination in the form of trotyl is sufficiently quick for their potential use as bioindicators.

4.3. Self-purification of Organisms with Trotyl and Its Metabolites

A next investigated group of caddisflies included the organisms which were subjected to the process of purification after the specific time of exposition against the presence of trotyl in the testing environment. Some insignificant differences were observed for the content of trotyl residues at control points 1h, 3h, 6h and 10h after purification, whereas the reduction of the level of residuals content is significant for the sample 24 h. The results of analyses clearly show that the content of trotyl in the organism which was subjected to 24-hour exposition followed by purification⁶ is the lowest, whereas the content of amine derivatives (2-amino-4,6-dinitrotoluene, 4-amino-2,6-dini-trotoluene) is the highest. Any presence of diamine trotyl derivatives was not noted.

⁵ W tym czasie trwał dalszy metabolizm trotylu na pochodne aminowe.

⁶ At that time the metabolism of trotyl into the amine derivatives was continued.

ny przyrost zawartości metabolitów pochodnych aminowych trotylu pomiędzy organizmami, które zostały poddane krótszej ekspozycji w stosunku do ekspozycji przez 24 h. Różnice między próbkami z 3 h, 6 h i 10 h ekspozycji po oczyszczaniu są nieznaczne. Zmiany pozostałej ilości trotylu w organizmach po procesie oczyszczania prezentuje tabela 3, natomiast wzrastającą ilość jego metabolitów w próbce w postaci (2-amino-4,6-dinitrotoluenu, 4-amino-2,6-dinitro-toluenu) – wykres 3.

The result of experiment shows a significant increment of content for metabolites of trotyl amine derivatives among the organisms which were treated by a shorter exposure than 24 h. Differences between the samples after 3 h, 6 h and 10 h exposition are insignificant. The changes of amount of trotyl left in organisms after the purification process are shown in table 3, and the increased number of its metabolites in samples in form of 2-amino-4,6-dinitrotoluene, and 4-amino-2,6-dinitro-toluene) – in diagram 3.

Tabela 3. Zbiorcza zawartość trotylu w częściach miękkich organizmów (MEI) poddanych procesowi oczyszczania z kolejnych punktów kontrolnych (dla $t_i=1/3/6/10/24/48$ h) – zakres elucji trotylu

Table 3. Summary of TNT content in soft parts of organisms (MEI) subjected to purification process from successive test points (for $t_i=1/3/6/10/24/48$ h) - TNT elution range

Opis Description	Czas [h] Time	Masa [mg] Weight	Związek chemiczny Chemical agent	C [mmol/g]
Część miękka larwy (MEI) poddana procesowi oczyszczania / A soft part of larva (MEI) treated by purification process	1	363,9	2,4,6-TNT	82,14
			2A-4,6DNT	16,50
			4A-2,6DNT	26,53
	3	434,7	2,4,6-TNT	95,88
			2A-4,6DNT	11,72
			4A-2,6DNT	33,34
	6	360,4	2,4,6-TNT	94,66
			2A-4,6DNT	19,33
			4A-2,6DNT	36,95
	10	434,5	2,4,6-TNT	76,06
			2A-4,6DNT	12,08
			4A-2,6DNT	25,27
24	502,7	2,4,6-TNT	22,08	
		2A-4,6DNT	7,43	
		4A-2,6DNT	35,85	

Zależność ilości badanych związków od czasu ekspozycji również przedstawia się zadowalająco. Oznaczone zawartości trotylu i jego pochodnych w częściach miękkich orga-

The dependence of the amount of investigated compounds on the time of exposition is also promising. The labelled contents of trotyl and its derivatives in the soft parts of

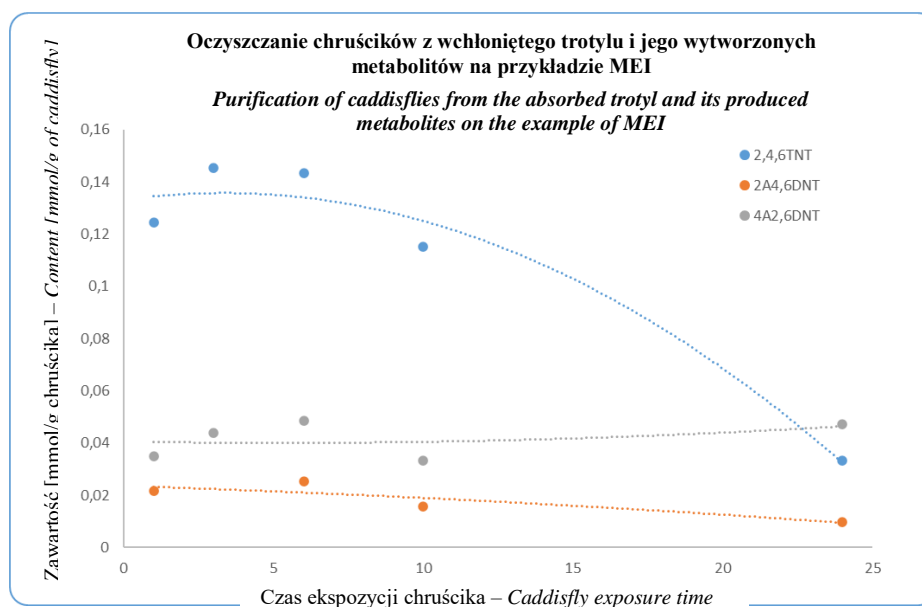
nizmów poddanych procesowi oczyszczania w wybranych punktach kontrolnych przedstawiono w tabeli 4 oraz na wykresie 4.

organisms treated by purification process in selected testing points are presented in table 4 and in diagram 4.

Tabela 4. Wyniki oznaczania zawartości trotylu oraz jego pochodnych dla wybranych punktów kontrolnych w częściach miękkich organizmów poddanych procesowi oczyszczania

Table 4. Results of the determination of TNT and its derivatives for selected control points in soft parts of treated organisms

Czas / Time [h]	MEI odp. – Zawartość / Content [mmol/g]		
	2,4,6-TNT	2A-4,6DNT	4A-2,6DNT
1	1,87	0,33	0,52
3	2,18	0,23	0,66
10	1,73	0,24	0,50
24	0,50	0,15	0,71



Wykres 4. Oznaczona zawartość trotylu i jego metabolitów dla wybranych punktów kontrolnych na przykładzie części miękkich (MEI) organizmów poddanych procesowi oczyszczania

Diagram 4. Determined content of TNT and its metabolites for selected control points on the example of soft parts (MEI) of organisms subjected to the purification process

5. Podsumowanie

Porównanie otrzymanych wyników badań części schitylizowanej i części miękkiej organizmów dla punktów kontrolnych 1 h i 24 h w celu określenia wpływu badanej tkanki/części organizmu na intensywność kumu-

5. Summary

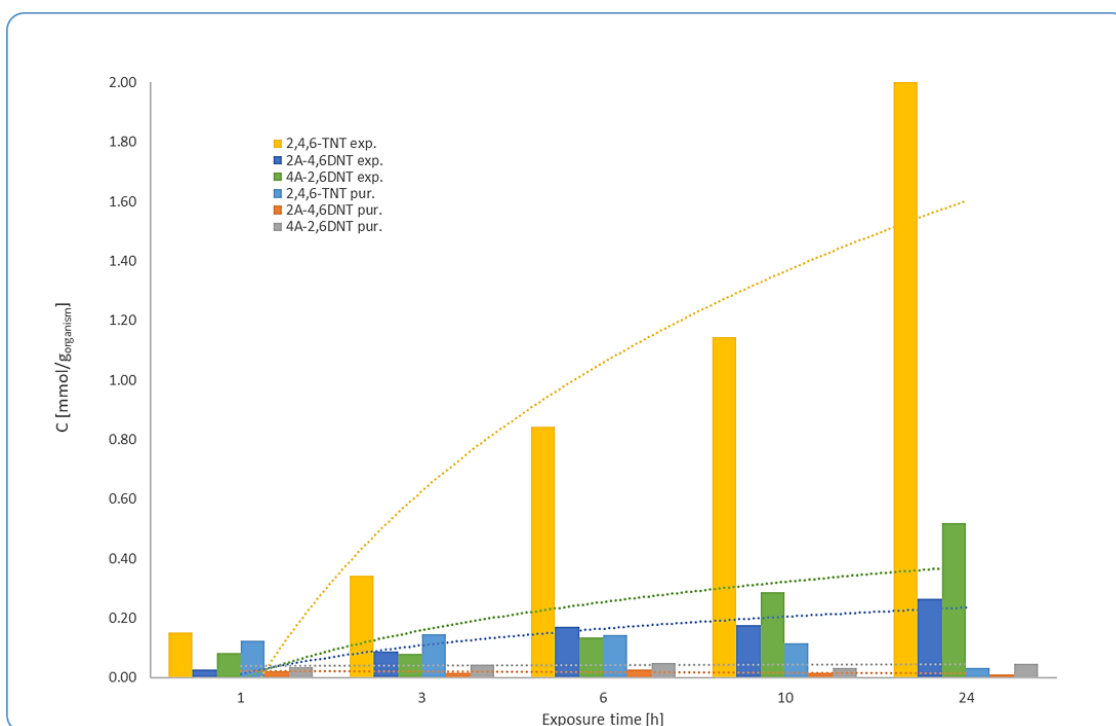
Comparison of received results of tests for the chitinized and soft parts of organisms in control points 1 h and 24 h, made to establish the influence of investigated tissue/part of organism into the intensity of

lacji testowanego zanieczyszczenia wskazuje wyraźnie większe wchłanianie trotylu oraz równie wyraźnie większy przyrost jego dwóch metabolizowanych pochodnych aminowych (2A-4,6-DNT, 4A-2,6-DNT) przez część miękką okrywającą odwłok larw chrząszczyków. Część schitynizowana okrywająca puszkę głowową i tułów w mniejszym stopniu wchłania czynnik stresowy, przez co analiza tej części obciążona jest większą niepewnością podczas oznaczania wytypowanych analitów.

Wszystkie zależności zachodzące podczas trwania eksperymentu – wchłanianie, metabolizmu, oczyszczanie zostały przedstawione w sposób graficzny na wykresie 5 jako zależność ilości badanych związków/analitów od czasu ekspozycji organizmów na czynnik stresowy oraz po procesie oczyszczania.

cumulation of tested contamination, clearly indicates that there is a significantly higher absorption of trotyl by the caddisfly larvae soft part covering their bottom part, accompanied by an equally significant increment of trotyl's two metabolised amine derivatives (2A-4,6-DNT, 4A-2,6-DNT). The chitinized part covering the head skull and torso absorbs the stressing agent in a lower degree and due to it the analysis of this part is burdened by greater uncertainty at marking the selected analities.

All relations occurring during the experiment – absorption, metabolism, purification – are presented in a graphical way in diagram 5 as dependence of the amount of investigated agents/analities on the time of exposure of organisms against the stressing agent, and after the process of purification.



Wykres 5. Zestawienie oznaczonych zawartość trotylu i jego metabolitów dla wybranych punktów kontrolnych na przykładzie części miękkich (MEI) organizmów poddanych ekspozycji i procesowi oczyszczania

Diagram 5. Summary of labeled TNT and its metabolites for selected control points using soft parts (MEI) of exposed and treated organisms as an example

Zestawione na wykresie 5, zmieniające się w czasie zawartości trotylu i jego metabolicznych pochodnych dla kolejnych punktów kontrolnych, na przykładzie części miękkich organizmów poddanych ekspozycji i procesowi oczyszczania, potwierdzają zastosowania larw chruścików bezdomkowych w celu biomonitoringu zanieczyszczeń w ekosystemach wodnych.

Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wstępnych można wyciągnąć wniosek, iż opracowana metodyka oznaczania śladów materiałów wybuchowych i ich pochodnych, takich jak trotyl, w złożonych matrycach organicznych, jest skuteczna. Opracowana metoda chromatograficzna wykorzystana podczas analiz próbek organicznych, takich jak larwy chruścików bezdomkowych, pozwala na wykrycie i monitorowanie potencjalnego zanieczyszczenia środowiska wodnego trotylem. W odpowiedzi na te zanieczyszczenia, larwy wodosówki potokowej z piątego stadium larwalnego zapewniają warunek szybkiej reakcji i stanowią obiecujący materiał, możliwy do zastosowania jako potencjalny biowskaźnik akumulacji.

W ostatnich latach opracowano szereg nowych metod oznaczania śladów materiałów wybuchowych w różnego rodzaju matrycach, takich jak gleba, woda czy też organizmy żywe. Wśród nich warto wymienić takie podejścia jak: spektrometria mas z detekcją mas [20], chromatografia gazowa z detekcją fluorescencyjną czy też immunoassy [21]. Te i inne metody pozwalają na bardzo precyzyjne oznaczanie śladów trotylu i jego pochodnych, co stanowi niezwykle ważne narzędzie w monitorowaniu zanieczyszczeń środowiska wodnego czy też gleby.

Kontynuowanie zaprezentowanych badań

Diagram 5 includes the contents of trotyl and its metabolite derivatives, changing in time, for successive control points on the example of the soft parts of organisms treated by exposition and the process of purification confirming the application of larvae of homeless caddisflies for biomonitoring of contaminations in aqueous ecosystems.

Conclusions

On the basis of results of performed tests a conclusion can be drawn that the method developed for marking the traces of explosive materials and their derivatives such as trotyl in complex biological matrixes is efficient. The chromatographic method developed and used for analysis of the organic samples such as larvae of homeless caddisflies can detect and monitor a potential contamination of the water environment by trotyl. In response to these contaminations the larvae of stream water bill of the fifth larval stadium meet the condition of rapid reaction and are the promising material which can be used as a potential bioindicator of accumulation.

A lot of new methods were developed in recent years labelling the traces of explosive materials in different types of matrixes such as soil, water, or the living organisms. It is worth to mention about following approaches: mass spectrometry with mass detection [20], gaseous chromatography with fluorescent detection, or the immunoassay [21]. Those and other methods can be used for very precise labelling of traces of trotyl and its derivatives what is an extremely significant tool in the monitoring of contaminations of the water and soil environment.

Continuation of presented tests in a wider scope is a proper step towards imple-

w szerszym zakresie jest właściwym krokiem w kierunku wdrożenia tej metody monitoringu jako narzędzia do wykrywania i kontrolowania zanieczyszczeń środowiska wodnego. Ponadto, badania te pozwolą na ocenę potencjalnego zagrożenia dla ludzi, wynikającego z przedostawania się trotylu do wód gruntowych. W tym celu niezbędne jest opracowanie skutecznej metodyki i wytypowanie organizmów wskaźnikowych do oznaczania zawartości trotylu i jego pochodnych w glebie.

Opracowana metoda chromatograficzna analizy zawartości trotylu i jego pochodnych w testowanych organizmach jest elastyczna i pozwala również na jednoczesną analizę innych materiałów wybuchowych, takich jak heksogen, pentryt, czy tetryl, stosowanych w przemyśle zbrojeniowym, górnictwie strzałowym i których pozostałości znajdują się na terenach składów materiałów wybuchowych i byłych działań militarnych, i stanowią zagrożenie dla środowiska. Planowane jest przeprowadzenie kolejnych eksperymentów, aby uwzględnić te materiały wybuchowe w analizach.

Podsumowując, wnioski z przeprowadzonych badań dotyczących metodyki oznaczania śladów materiałów wybuchowych i ich pochodnych w złożonych matrycach, takich jak organizmy żywe czy gleba, są bardzo obiecujące. Wydaje się, że opracowane metody pozwolą na monitorowanie stanu środowiska wodnego i gleby w kontekście zanieczyszczenia trotylem i jego pochodnymi, a także pozwolą na ocenę potencjalnego zagrożenia zdrowia ludzi i zwierząt.

Obecne badania w dziedzinie detekcji śladów materiałów wybuchowych i ich pochodnych w glebie koncentrują się na doskonaleniu już istniejących metod oraz poszukiwaniu nowych, bardziej skutecznych sposobów. Wnioski z tych badań stanowią ważne wsparcie dla dalszych prac w tym zakresie.

mentation of this monitoring method as a tool for detection and survey of contamination in water environment. Moreover, these investigations can assess a potential threat for people due to migration of trotyl to the ground waters. For this reason an efficient methodology has to be developed and the indicating organisms have to be chosen for labelling the content of trotyl and its derivatives in the soil.

The chromatographic method developed for analysis of content of trotyl and its derivatives in tested organisms is flexible and at the same time can be used to analyse other explosive materials such as hexogen, penthrite, or tetryl which are used in the defence industry, and in shot mining industry, and the residuals of them are still present in the places of depots of explosive materials and former military operations creating the threat to the environment. Some next experiments are planned in the future in order to include these materials in the analyses.

Summing it up, the conclusions from the performed investigations over the methodology for labelling the traces of explosive materials and their derivatives in the complex matrixes such as living organisms or soil are very promising. It seems that the developed methods can be used for monitoring the status of water and soil environment in the context of contamination by trotyl and its derivatives, and for assessment of potential threat to the health of people and animals, as well.

Present investigations over detection of traces of explosive materials and their derivatives in the soil are focused on the perfection of already existing methods and searching some new and more efficient ones. Conclusions drawn from these investigations constitute important arguments supporting the further work in this domain.

Literatura / Literature

- [1] Thomas A. Lewis, David A. Newcombe, Ronald L. Crawford. 2004. "Bioremediation of soils contaminated with explosives". *Journal of Environmental Management*, 70, 291–307.
- [2] Talmage S.S.; D.M. Opresko, C.J. Maxwell, C.J.E. Welsh, M. Cretella, P.H. Reno, F.B. Daniel. 1999. "Nitroaromatic Munition Compounds: Environmental Effects and Screening Values". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 161, 1–156.
- [3] Harkonen, H., M. Karki, A. Lahti, H. Savolainen. 1983. "Early equatorial cataracts in workers exposed to trinitrotoluene". *American Journal of Ophthalmology*, 95, 807–810.
- [4] Hathaway, J.A. 1977. "Trinitrotoluene: A review of reported dose-related effects providing documentation for a workplace standard". *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 19, 341–345.
- [5] Sabbioni, G., Y.Y. Liu, H. Yan, O. Sepai. 2005. "Hemoglobin adducts, urinary metabolites and health effects in 2,4,6-trinitrotoluene exposed workers". *Carcinogenesis*, 26, 1272–1279.
- [6] Kim Hee Joung, Seoyoung Ki, Ahmed A. Raslan, Ok Kyu Park. 2016. "3D Visualization of Developmental Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Zebrafish Embryogenesis Using Light-Sheet Microscopy", *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1925.
- [7] Wysocka A., Olszyna A., Komorowska I., Popowska M. 2017. „Nitrozwiązki aromatyczne – charakterystyka i metody biodegradacji”. *Postępy Mikrobiologii*, 56, 3, 289–305.
- [8] Bolt H.M., Degen G.H., Dorn S.B., Plöttner S., Harth V., 2006. "Genotoxicity and potential carcinogenicity of 2,4,6-trinitrotoluene: Structural and toxicological considerations". *Reviews on Environmental Health*, 21, 4, 217–228.
- [9] Koske D.; Goldenstein N.I, Kammann U. 2019. "Nitroaromatic compounds damage the DNA of zebrafish embryos (*Danio rerio*)". *Aquatic Toxicology*, 217, 105345.
- [10] Bernstein A., Zeev R. 2011. Rozdział: "Biodegradation of the Explosives TNT, RDX and HMX". *Microbial Degradation of Xenobiotics*, 135-176 Berlin: Springer Berlin-Heidelberg
- [11] Belden Jason B., Ownby David R., Guilherme R., Lotufo, Lydy, Michael J. 2005. "Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 2—Bioconcentration in aquatic invertebrates and potential for trophic transfer to channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". *Chemosphere*, 58, 1161–1168.
- [12] Saka, M. 2004. Developmental toxicity of p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1065–1073.
- [13] Green, A., Moore D., Farrar, J.D. 1999. „Chronic toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene to a marine polychaete and an estuarine amphipod". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1783–1790.
- [14] Steevens, J.A., Duke, B.M, Lotufo, G.R., Bridges, T.S. 2002. „Toxicity of the explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetra-zocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*: Low-dose hormesis and high-dose mortality". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 1475–1482.
- [15] Conder, J.M., La Point, T.W., Steevens, J.A., G.R. Lotufo. 2004. "Recommendations for the assessment of TNT toxicity in sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 141–149 i ryb.
- [16] Hovatter, P.S., Talmage, S.S, Opresko, D.M., Ross, R.H. 1997. "Ecotoxicity of nitroaromatics to aquatic and terrestrial species at army superfund sites". Dwyer, W., Doane, F.J. T.R., Hinman M.L., (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Modeling and Risk Assessment*, 6, ASTM STP 1317. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, 117–129.

- [17] Tszedel, M., Błońska, D., Józwiak, P., Józwiak, M. 2021. "SEM-EDX analysis of heavy metals in anal papillae of *Hydropsyche angustipennis* larvae (Trichoptera, Insecta) as a support for water quality assessment". *The European Zoological Journal*, 88(1), 718–730.
- [18] Rochfort, Q., Grapentine, L., Marsalek, J., Brownlee, B., Reynoldson, T., Thompson, S., Milani, D., Logan, C. 2000. "Using benthic assessment techniques to determine combined sewer overflow and stormwater impacts in the aquatic ecosystem". *Water Quality Research Journal* 35(3), 365–398.
- [19] Wright, JF. 2000. An introduction to RIVPACS. W *Assessing the biological quality of fresh waters: RIVPACS and other techniques*, 1–24. Cumbria: Freshwater Biological Association.
- [20] Mary Celin, Sharma, S., Bhanot, B., Kalsi, P., Sahai, A., S, and Tanwar, RK. „Trends in environmental monitoring of high explosives present in soil/sediment/groundwater using LC-MS/MS.”, *Mass Spectrometry Reviews*, (2022);e21778. DOI: 10.1002/mas.21778.
- [21] Sina, Y., Rabbany, William J Lane, William A Marganski, Anne W Kusterbeck, Frances S Ligler, „Trace detection of explosives using a membrane-based displacement immunoassay”, *Journal of Immunological Methods*, Volume 246, Issues 1–2, 2000, Pages 69-77, ISSN 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00301-X.

