**UTJECAJ TOKSIČNOSTI KALIJEVA NITRATA NA PUŽA**

***Melanoides tuberculata* M.**

**Autori: Magdalena Lugarić, Petra Marija Rajković, Marija Tankosić
Mentor: Mirjana Krpan, prof.**

**Ženska opća gimnazija Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti
Zagreb**

1. **Istraživačka pitanja/Hipoteze**

Zbog ogromnog napretka u poljoprivredi i industriji organizmi su danas suočeni s mnoštvom promjena u okolišu.Promjene se odnose na uništavanje prirodnih staništa, prisutnost teških metala, pesticida i drugih onečišćivača.(1) Sve je izraženija potreba za razvojem brzih i preciznih metoda za što raniju detekciju početnih promjena u ekosustavima uzrokovanih onečišćenjem. Danas postoji ogroman broj metoda za analizu stupnja onečišćenja okoliša odnosno kvalitete voda.(2) Zbog sve učestalijeg ispuštanja industrijskih otpadnih voda (često nepoznatog kemijskog sastava) u okoliš, potrebno je istraživanje utjecaja toksičnih sastojaka vode na akvatičke organizme.(5) Kao biološki indikatori onečišćenja od svih makroavertebrata najčešće se upotrebljavaju mekušci.(3) U znanstvenoj literaturi postoji velik broj najraznolikijih metoda koje koriste ove životinje u ispitivanjima toksičnosti otpadnih voda. Mjerenje količine nitrata važan je korak u određivanju kvalitete vode.Nitrati su povoljni za rast algi i drugih vodenih biljaka.Prirodni izvori povećanja koncentracije nitrata u vodi su kiša, snijeg, magla ili raspad organske tvari u tlu ili u sedimentu.Primjenom umjetnih gnojiva u poljoprivredi, povećava se i koncentracija dušika u tlu i u vodi.Dušik se ispire iz tla kišom i dolazi u jezera, rijeke i mora.Kanalizacijski ispusti drugi su štetan umjetni izvor nitrata u vodi.Kod prevelikih koncentracija dolazi do promjena mirisa i okusa vode.Prema GLOBE protokolima za nitrate toksični učinci na životinjske organizme u vodi javljaju se na tek vrlo visokim koncentracijama (>90 mg/L N03-).(11)

Ovim istraživanjem pokušali smo dati odgovor je li toksikant kalijev nitrat svojim prisustvom u vodenim staništima može ugroziti opstanak vrste puža *Melanoides tuberculata*.(4) Kalijev nitrat (KNO3, salitra) bijeli je kristal topljiv u vodi.(6,7) U prirodi nastaje nitrifikacijom organskih spojeva s dušikom u prisutnosti kalijevih soli. Najviše se upotrebljava kao umjetno gnojivo.(10)

Naša pretpostavka je da će u otopini s najvećom koncentracijom nitrata (90 mg/L prema GLOBE protokolima) biti najmanji broj mrijestova, veličina puževih kućica najmanja, a smrtnost najveća. Kod puževa u otopini gdje je koncentracija nitrata 60 mg/L pretpostavljamo da će smrtnost biti manja, manji broj mrijestova i veća veličina puževih kućica.U otopini gdje ima najmanje nitrata ( 30 mg/L) očekujemo da će promjene biti najmanje.Smrtnost puževa će biti najmanja, najveći broj mrijestova i veličina kućica najveća.

1. **Metode istraživanja**

U ovom radu istraživanje je obavljeno na vrsti puža *Melanoides turbeculata*.To su maleni puževi, uskih, šiljatih kućica, a pripadnici su prednjoškržnjaka (Prosobranchia).Obično su smeđe boje s crvenkastim točkastim oznakama.Odrasli primjerci mogu narasti čak između 3 i 8 cm.Kućice imaju 10 do 15 zavoja i vrlo su čvrste, ali u mekanim, kiselijim vodama vrhovi kućica se otapaju i postaju tupi.U slučaju opasnosti povlače se u kućicu koju zatvaraju pokrovom (operculum).Tijekom dana borave zakopani u podlogu.Ovi puževi se razmnožavaju ovoviviparno (ženka u sebi nosi oplođena jaja) ili partenogenezom (razvijanjem iz neoplođenih jajnih stanica).Mladi puževi izlaze iz ženke kao posve razvijene jedinke veličine oko 1-2 mm i zato ih ponegdje zovu živorodni puževi.Puževi su spolno zreli kada dosegnu dužinu od oko 5-10 mm.U povoljnim uvjetima se vrlo brzo razmnožavaju.(9) Potječu iz sporijih tekućica, jezera i močvara Afrike i Azije.U današnje doba su se proširili na tropske dijelove Sjeverne i Južne Amerike dok su na nekim područjima istisnuli autohtone vrste puževa.Toleriraju boćatu vodu i vrlo su otporni na loše uvjete i nedostatak kisika u akvariju, a mogu preživjeti i određeno vrijeme bez vode.Ovi puževi su vrlo poželjni među akvaristima zbog nekoliko razloga:ne diraju biljke, dane provode zakopani u podlogu pa ne narušavaju izgled akvarija i prozračuju podlogu odstranjujući tako loše anaerobne zone.(11) Ovaj mekušac odabran je za istraživanje jer se lako uzgaja u laboratorijskim uvjetima, kratkog je životnog ciklusa, ima veliki broj mrijestova i malu smrtnost.U nekoliko staklenih posuda pužići su bili izloženi različitim koncentracijama toksikanta, ali istoj sobnoj temperaturi i osvjetljenju.Tijekom trajanja testa praćen je broj mrijestova, rast, smrtnost i ponašanje životinja.U svrhu promatranja i uspoređivanja rasta ispitivanog puža mjerena je veličina kućice puževa. Prilikom mjerenja upotrijebljen je milimetarski papir.U akvatičkom testu toksičnosti korištena je otopina kalijeva nitrata.Ispitivane su tri koncentracije otopine soli kalijeva nitrata.Vrijeme trajanja testova bilo je 6 tjedana.

**Postavljanje testa**

Za svaku pojedinu koncentraciju otopine toksikanta postavljeno je pet laboratorijskih čaša volumena 1,5 L od kojih su tri sadržavale 1 L otopine toksikanta odgovarajuće koncentracije, a preostale dvije su bile kontrolne, s običnom vodom.U svaku od pet čaša dodano je deset puževa podjednake veličine.Početna veličina iznosila je između 8 do 12,5 mm.Čaše su bile pokrivene poklopcem da se spriječi isparavanje vode iz posude i tako održi koncentracija otopine konstantnom. Za hranu su životinje dobivale komadiće zelene salate koja je prethodno oprana.Salata je dodavana više puta tjedno po potrebi.Prebrojavani su mrijestovi i skidani sa stijenke posuda.Isto tako, praćeno je ponašanje, rast i smrtnost životinja.Prema GLOBE protokolima mjerili smo temperaturu vode, pH vode i koncentraciju otopljenog kisika.

1. **Prikaz i analiza podataka**

Praćenjem ponašanja test puževa u ispitivanim koncentracijama kalijeva nitrata nisu zapažene nikakve posebne promjene u ponašanju u usporedbi s puževima u kontrolnim čašama.Pružaju tijelo iz kućice, kreću se naokolo i obnavljaju svoj zračni mjehurić na površini vode.U sve tri otopine navedenih koncentracija došlo je do smanjenja kvantitete mriješćenja tim više što je bila viša koncentracija toksikanta (tablice1,2 i 3). Prosječan broj mrijestova u test čašama najniže koncentracije je za 1,3 puta manji u odnosu na kontrolne čaše, dok je u otopini koncentracije 60 mg/L taj iznos za 1,4 puta manji, a otopini koncentracije 90 mg/L čak za 2,2 puta manji.To nam pokazuje daje uzrok smanjenom broju mrijestova djelovanje toksikanta na organizam.Kvantiteta mriješćenja prikazana je na slikama 1,2 i 3 i tablice 4, 5, 6, 7). Nakon završenog testa veličina puževih kućica povećala se i u kontrolnim i u test čašama. Puževi u test čašama uvijek su manji od kontrolnih puževa.Prirast kontrolnih puževa u odnosu na puževe u test čašama je u otopini koncentracije 30 mg/L tri puta veći, u otopini koncentracije 60 mg/L je dva puta veći, a u otopini koncentracije 90 mg/L tri puta veći.Dakle, nije zapažena nikakva razlika u prirastu koja bi bila ovisna o porastu koncentracije.U kontrolnim otopinama smrtnosti nije bilo, dok je u otopini koncentracije 60 mg/L smrtnost iznosila 3,3%.U otopini koncentracije 30 mg/L smrtnosti nije bilo. Utvrđena niska smrtnost ne može se smatrati značajnom. U toksikološkim testovima tolerira se do 10% smrtnosti (tablice 7,8,9).

K1, K2 – kontrolne posude

T1, T2, T3 – testne posude

Σ – zbroj mrijestova u posudi na kraju testa

Tablica 1. Ukupan broj mrijestova u kontrolnim i test čašama po tjednima u
 otopini koncentracije 30 mg/L

|  |  |
| --- | --- |
|  | **BROJ TJEDANA** |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **Σ** |
| **K1** | 24 | 29 | 55 | 53 | 53 | 46 | 260 |
| **K2** | 47 | 34 | 38 | 37 | 49 | 41 | 246 |
| **T1** | 51 | 48 | 30 | 28 | 30 | 34 | 221 |
| **T2** | 36 | 47 | 28 | 30 | 26 | 25 | 192 |
| **T3** | 53 | 28 | 27 | 25 | 18 | 32 | 183 |

Tablica 2. Prosječan broj mrijestova u testnim i kontrolnim čašama po tjednima
 (izvedena prema tablici 1.)

|  |  |
| --- | --- |
|  | **BROJ TJEDANA** |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **TEST** | 46,7 | 41,0 | 28,3 | 27,7 | 24,7 | 30,3 |
| **KONTROLA** | 35,5 | 31,5 | 46,5 | 45,0 | 51,0 | 43,5 |

Slika1.Prikaz kvantitete mriješćenja u testnim čašama u odnosu na kontrolne po tjednima
 (izveden prema tablici 2.)

Tablica 3. Ukupan broj mrijestova u kontrolnim i testnim čašama po tjednima za otopinu koncentracije 60 mg/L

|  |  |
| --- | --- |
|  | **BROJ TJEDANA** |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **Σ** |
| **K1** | 34 | 29 | 48 | 52 | 47 | 58 | 268 |
| **K2** | 44 | 31 | 41 | 50 | 41 | 50 | 257 |
| **T1** | 56 | 40 | 41 | 16 | 13 | 27 | 193 |
| **T2** | 54 | 40 | 38 | 24 | 17 | 23 | 196 |
| **T3** | 54 | 22 | 43 | 23 | 14 | 14 | 170 |

Tablica 4. Prosječan broj mrijestova u testnim i kontrolnim čašama po tjednima
 (izvedena prema tablici 3.)

|  |  |
| --- | --- |
|  | **BROJ TJEDANA** |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **TEST** | 54,7 | 34,0 | 40,7 | 21,0 | 14,7 | 21,3 |
| **KONTROLA** | 39,0 | 30,0 | 44,5 | 51,0 | 44,0 | 54,0 |

Slika 2.Prikaz kvantitete mriješćenja u testnim čašama u odnosu na kontrolne po tjednima (izveden prema tablici 4.)

Tablica 5. Ukupan broj mrijestova u kontrolnim i testnim čašama po tjednima
 za otopinu koncentracije 90 mg/L

|  |  |
| --- | --- |
|  | **BROJ TJEDANA** |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **Σ** |
| **K1** | 27 | 35 | 25 | 29 | 42 | 36 | 194 |
| **K2** | 36 | 46 | 39 | 42 | 37 | 39 | 239 |
| **T1** | 11 | 15 | 10 | 18 | 9 | 12 | 75 |
| **T2** | 26 | 18 | 22 | 20 | 12 | 7 | 105 |
| **T3** | 23 | 15 | 18 | 31 | 17 | 7 | 111 |

Tablica 6. Prosječan broj mrijestova u testnim i kontrolnim čašama po tjednima
 (izvedena prema tablici 5.)

|  |  |
| --- | --- |
|  | **BROJ TJEDANA** |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **TEST** | 20,0 | 16,0 | 16,7 | 23,0 | 12,7 | 8,7 |
| **KONTROLA** | 31,5 | 40,5 | 32,0 | 35,5 | 39,5 | 37,5 |

Slika 3. Prikaz kvantitete mriješćenja u testnim čašama u odnosu na kontrolne po tjednima (izveden prema tablici 6.)

Tablica 7. Odnos početne i konačne veličine puževa u otopini koncentracije 30 mg/L

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **POČETNA VELIČINA** | **KONAČNA VELIČINA** |
| **TEST** | **KONTROLA** |
| **PRIRAST** | 12,5 mm | 13,2 mm | 14,6 mm |

Tablica 8. Odnos početne i konačne veličine puževa u otopini koncentracije 60 mg/L

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **POČETNA VELIČINA** | **KONAČNA VELIČINA** |
| **TEST** | **KONTROLA** |
| **PRIRAST** | 10,0 mm | 11,2 mm | 12,4 mm |

Tablica 9. Odnos početne i konačne veličine puževa u otopini koncentracije 90 mg/L

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **POČETNA VELIČINA** | **KONAČNA VELIČINA** |
| **TEST** | **KONTROLA** |
| **PRIRAST** | 10,6 mm | 11,0 mm | 11,8 mm |

1. **Zaključci**

Ovim istraživanjem pokušao se dati odgovor je li toksikant kalijev nitrat prisustvom u vodenim staništima može ugroziti opstanak vrste puža *Melanoides tuberculata*. Tijekom trajanja testa (6 tjedana) praćen je broj mrijestova, rast, smrtnost i ponašanje životinja.Temperatura vode u kontrolnim posudama kretala se u rasponu od 16 do 20°C, pH vode od 7 do 8, a količina otopljenog kisika od 5,0 do 7,4 mg/L. Praćenjem ponašanja test puževa u ispitivanim koncentracijama kalijeva nitrata nisu zapažene nikakve posebne promjene u ponašanju u usporedbi s puževima u kontrolnim čašama. Prosječan broj mrijestova u test čašama najniže koncentracije je za 1,3 puta manji u odnosu na kontrolne čaše, dok je u otopini koncentracije 60 mg/L taj odnos za 1,4 puta manji, a u otopini koncentracije 90 mg/L čak za 2,2 puta manji. U kontrolnim otopinama smrtnosti nije bilo, dok je u otopini koncentracije 60 mg/L i otopini koncentracije 90 mg/L smrtnost iznosila 3,3%.U istraživanju je dokazano da se ispitivani puž može prilagoditi na povišene koncentracije nitratnih iona u vodi pod uvjetom da ispitivana koncentracija ne bi bila tolika da izazove veliku smrtnost ili potpuni prestanak mriješćenja životinja.

1. **Literatura**

1.Stilinović B(1995): Mikrobna korozija i mogućnosti njezine kontrole u rashladnim tornjevima. Hrvatska vodoprivreda br 34:22-25

2.Erben R, Lajtner J(1995): Akvatički testovi toksičnosti. Hrvatska vodoprivreda br 28:30-32

3.Klobučar G I V, Lajtner J, Erben R(1996): Biomonitoring i biomarkeri. Hrvatska vodoprivreda br 50:50-54.

4.Sauerborn R, Smital T (1998): Mehanizam multiksenobiotične otpornosti u vodenih organizama. Priroda br 847:36-37.

5.Dvoraček L, Stilinović B (1998): Uporaba mikrobioloških testova u određivanju toksičnosti industrijskih otpadnih voda. Hrvatska vodoprivreda br 69:60-67

6.Habuš A, Stričević D, Tomašić V (2005): Anorganska kemija. Profil.

7.Nöthig-Hus D, Herak M, Novosel F (2008): Opća kemija 2. Školska knjiga.

8.Lipanović S, Filipović I (1998): Opća i anorganska kemija. Školska knjiga.

9. <http://www.jadran.izor.hr/hr/nastava/solic/EKOLOGIJA/SKRIPTA.pdf>

10.<http://www.globe.pomsk.hr/prirucnik.htm>

11.<http://www.opak.crolib.hr/cgi-bin/unicat.cgi?form=D1990423064>