

## OS PROTOZOÁRIOS COMO FERRAMENTA DA MONITORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA POLUIÇÃO: ENSAIOS *IN VITRO*

NICOLAU<sup>1</sup>, N. DIAS<sup>1,2</sup>, G.S. CARVALHO<sup>2</sup>, M. MOTA<sup>1</sup> e N. LIMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Engenharia Biológica – IBQF, Universidade do Minho, 4700-320 Braga, Portugal

<sup>2</sup>Instituto de Engenharia Biomédica, Praça Coronel Pacheco nº1, 4050 Porto, Portugal

### RESUMO

Os protozoários, e particularmente os ciliados, são essenciais nos processos de depuração biológica e aeróbica das águas residuais e constituem, por outro lado, um grupo de organismos muito sensível às alterações ambientais. Neste trabalho, pretende-se salientar a sua importância como indicadores da qualidade da água em ensaios *in vitro*, nomeadamente no que diz respeito à introdução de compostos tóxicos em concentrações sub-letais. Foi utilizado o ciliado nadador *Tetrahymena pyriformis* GL e estudada a sua resposta fisiológica à presença de quatro compostos tóxicos: o cobre, o zinco, o Triton X-100 e a cicloheximida. Os seus efeitos foram avaliados em termos de mortalidade, crescimento, capacidade predatória, disponibilidade energética (ATP), actividade da fosfatase ácida (ACP) e actividade das desidrogenases capazes de reduzirem o tetrazólio (MTT). De um modo geral, concentrações crescentes dos tóxicos provocaram inibições crescentes das respostas fisiológicas, mas as concentrações mais baixas de alguns dos tóxicos tiveram o efeito inverso em alguns dos parâmetros estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Protozoários, Toxicidade, Resposta fisiológica, Indicadores biológicos, Miniaturização.

### INTRODUÇÃO

A poluição ambiental crescente e o aparecimento continuado de novas substâncias químicas levaram a uma preocupação cada vez maior e mais disseminada na sociedade acerca dos seus potenciais efeitos, directos ou indirectos, na saúde humana. A avaliação da toxicidade de vários compostos pode ser levada a cabo através dos designados organismos-teste, que são usados como modelo da resposta de qualquer ser vivo a esses compostos, sempre com a saúde humana como objectivo principal. Estes testes seduzem sobretudo pela sua simplicidade e grau de reprodutibilidade, mas os organismos-teste devem reunir um conjunto de características importantes: devem ser organismos eucariontes, a sua biologia deve estar bem documentada, a sua manipulação e cultura em laboratório deve ser fácil e, em estudos de efeitos a longo prazo, devem apresentar

preferencialmente tempos de geração relativamente curtos (Nilsson, 1989). O ciliado *T. pyriformis* cumpre todos estes requisitos e a sua biologia e bioquímica foram amplamente estudadas nos últimos 50 anos. Foi também o primeiro protozoário a ser cultivado em condições axénicas, *i.e.*, em meio nutritivo com composição definida e na ausência de outros seres vivos, o que traz muitas vantagens em estudos onde a adição de um composto pode ser assim o único factor a variar nas condições de cultura.

No presente trabalho, foi avaliada a toxicidade do cobre, zinco, Triton X-100 e da cicloheximida no ciliado *T. pyriformis*, através do estudo de uma série de parâmetros em ensaios miniaturizados. A miniaturização *in vitro* tem sido apontada como uma importante ferramenta na avaliação precoce dos efeitos de tóxicos e outras substâncias químicas, inclusivamente em estudos de citotoxicidade de novos agentes da quimioterapia anti-cancerígena, pois permite minimizar a quantidade das substâncias químicas e dos organismos-teste, facilita o manuseamento e a experimentação laboratorial e torna os ensaios mais seguros.

Os parâmetros usados para a avaliação da toxicidade em *T. pyriformis* foram a mortalidade, o crescimento, a capacidade de predação de microesferas de latex fluorescentes, o doseamento do ATP pelo método da bioluminescência, a determinação da redução metabólica de sais de tetrazólio e a determinação da actividade da fosfatase ácida. Com a determinação destes parâmetros pretendeu-se estimar a condição fisiológica de *T. pyriformis* após exposição aos compostos tóxicos utilizados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Organismo e meio de cultura**

Em todos os ensaios partiu-se de culturas axénicas de *T. pyriformis* com 18-24 horas de incubação. O meio de cultura usado é designado por PPY (Proteose Peptone Yeast Extract Medium; CCAP, Aberdeen, UK) e contém 20,0 g/L de Proteose Peptona e 2,5 g/L de Extracto de Levedura e o seu pH a 20°C situa-se entre 6,6 e 6,8.

### **Compostos tóxicos**

O cobre, sob a forma de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , foi adicionado ao meio de cultura em cinco concentrações: 50; 100; 200; 300 e 400 mg/L. O zinco, sob a forma de  $\text{ZnCl}_2$ , foi adicionado em quatro concentrações; 50; 100; 200 e 300 mg/L. Em ambos os casos, a alteração do pH subsequente à adição dos tóxicos foi corrigida pela adição de NaOH 0,1N. As concentrações de metal solúvel, considerado como a parte biodisponível (Madoni *et al.*, 1992), foram obtidas por determinação fotométrica (Merk Spectroquant Methods), após diálise através de membrana celulósica de 3500 Da e digestão com ácido nítrico a 65% (Tabela I). Antes dos ensaios de toxicidade, foi feito um ensaio de controlo no sentido de se determinar a influência do ião cloro e não foi detectado

qualquer efeito em termos de crescimento e mortalidade nas concentrações em que foi usado nos ensaios com os metais.

**Tabela I** – Concentrações dos metais no meio de cultura

Concentração inicial de metal (mg/L)	Concentração de metal solúvel (mg/L)	
	Cobre	Zinco
50	30	15
100	65	45
200	145	120
300	200	200
400	275	---

O Triton X-100, um surfactante neutro que desorganiza e rompe as membranas celulares, foi adicionado ao meio de cultura em cinco concentrações: 12,5; 25,0; 37,5; 50,0 e 75,0 mg/L.

A cicloheximida, um antibiótico que inibe a síntese proteica em células eucarióticas, foi usado em concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/L nos ensaios de predação, de 0,0002; 0,001; 0,002; 0,01 e 0,05 mg/L nos ensaios de crescimento e mortalidade e 0,0002; 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L nos restantes (MTT, ATP, ACP). Optou-se por diferentes gamas de concentrações, pois a primeira gama de concentrações não permitia o crescimento celular em nenhuma das concentrações e a segunda gama não afectava a predação. A gama de concentrações para os restantes ensaios engloba as outras duas.

### Ensaio de toxicidade

Para todos os ensaios excepto para o da predação, *T. pyriformis* foi incubada nas soluções tóxicas, durante 48 horas, em microplacas de 96 poços, cada poço contendo 300 µL: 200 µL de PPY com ou sem tóxico (este no caso dos controlos) e 100 µL de inóculo de *T. pyriformis*. Para cada concentração testada e cada tempo de amostragem, foram feitas 3 réplicas, sempre de poços diferentes. Para cada um dos tóxicos, cada parâmetro foi estudado em dois ensaios independentes. Os ensaios de predação foram realizados em microplacas de 24 poços, cada poço contendo 1500 µL: 1000 µL de PPY com ou sem tóxico e 500 µL de inóculo. Foram realizados, neste caso, três ensaios independentes com cada um dos tóxicos. Todos os ensaios foram realizados a 20±1°C.

**Ensaio de crescimento e mortalidade:** a densidade das culturas foi estimada com base na observação microscópica de três amostras de 25 µL, extraídas com uma micropipeta automática, de acordo com Madoni (1994). As três amostras foram recolhidas após 1; 6; 12; 24 e 48 horas de exposição ao tóxico, sempre de poços diferentes, e observadas ao microscópio óptico de inversão (NIKON Diaphot 300), com uma ampliação de 100X. As células imóveis foram consideradas mortas. Depois, uma gota de 5 µL de formalina

a 4% em água foi adicionada e o número total de células (mortas + vivas) foi contado. A mortalidade foi determinada em termos de percentagem do número total de células.

**Ensaio de predação:** a cada poço foram adicionadas microesferas de latex fluorescentes com 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro numa concentração de cerca de  $1,05 \times 10^6 \text{mL}$ , assumindo, como Fenchel (1980), que os ciliados não distinguem as partículas a predação não ser pelo seu tamanho ou forma, e portanto ingerem estas microesferas do mesmo modo que o fariam com bactérias, seu alimento natural. Ensaio prévios foram realizados, no sentido de se determinar qual o tamanho e a concentração ideais destas microesferas no meio para a observação microscópica e a subsequente contagem das microesferas ingeridas. Para cada concentração testada, uma amostra de 50  $\mu\text{L}$  foi retirada após 1; 10 e 20 minutos de exposição ao tóxico; 10  $\mu\text{L}$  de formalina a 4% em água foi adicionada e a amostra guardada no escuro até à observação microscópica em epifluorescência (ZEISS Axioscop) com uma ampliação de 100X: quando um ciliado era localizado, a luz incidente era mudada para UV (EX450-490, FT510 e BA520) e contado o número de microesferas ingeridas com uma ampliação de 400X. Em cada amostra foi determinado o número total de microesferas ingeridas por 30 ciliados.

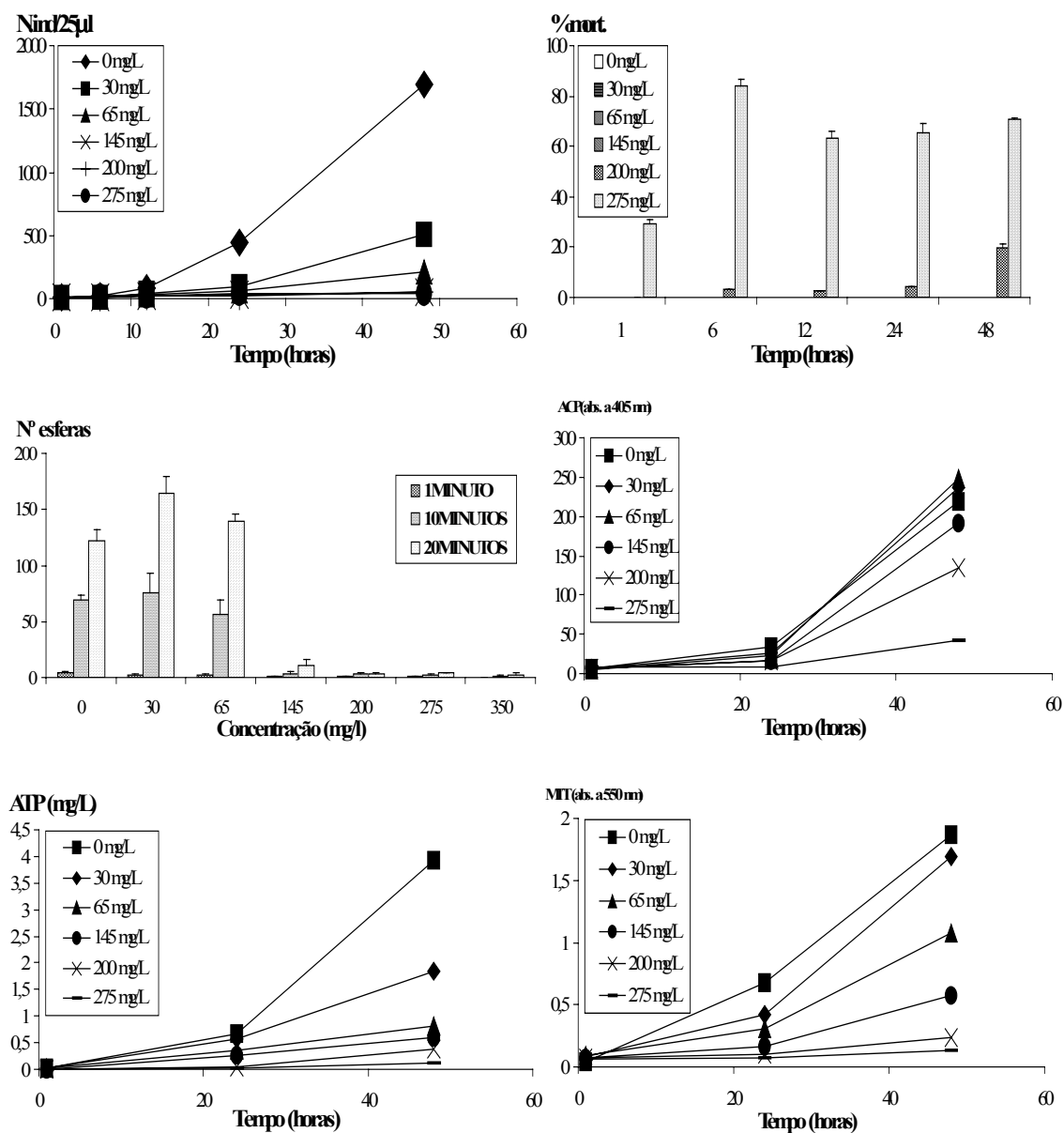
**Ensaio do MTT:** este método avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. Este método, sugerido pela primeira vez por Mossman (1983), foi modificado especificamente para células em suspensão, nomeadamente *T. pyriformis*, por Dias *et al.* (1999) em placas de 96 poços: a 140  $\mu\text{L}$  de cultura são adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de MTT (10 mg/L) deixando-se a incubar durante 4 horas; são então adicionados 150  $\mu\text{L}$  de DMSO e, após 30 minutos, é feita a leitura a 550 nm, num leitor ELISA. Para cada concentração foram retiradas três amostras após 1; 24 e 48 horas de exposição a cada tóxico.

**Ensaio do ATP:** a determinação do teor energético em ATP foi feita pelo método da quantificação da bioluminescência em LUMAC Biocounter após exposição a um complexo luciferina/luciferase (LUMIT). Para cada concentração foram retiradas três amostras após 1; 24 e 48 horas de exposição a cada tóxico.

**Ensaio da ACP:** com este ensaio pretende-se estimar a actividade digestiva e enzimática da célula, em mais uma avaliação do seu estado metabólico. O método baseia-se na redução do  $\alpha$ -naftil fosfato a  $\alpha$ -naftol pela fosfatase ácida e libertação do cromóforo "Fast Red" que pode ser quantificado em espectrofotómetro a 405 nm; no presente trabalho, foi seguido o método da Sigma (435-A) e o ensaio foi miniaturizado usando-se as microplacas de 96 poços e o leitor ELISA. Para cada concentração foram retiradas três amostras após 1; 24 e 48 horas de exposição a cada tóxico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dado que as diferenças dos resultados não foram estatisticamente significativas nos dois ensaios de toxicidade, a Figura 1 mostra os resultados de um dos ensaios.



**Figura 1** – Resultados dos ensaios de toxicidade após exposição ao cobre: crescimento, mortalidade, predação, ACP, ATP e MTT.

Observou-se, neste caso, uma estimulação da predação com as duas concentrações de cobre mais baixas (50 e 100 mg/L) o que foi já referido por outros autores (Nilsson, 1981; Wakatsuki, 1996). Ainda no caso do cobre, observa-se um padrão de respostas muito semelhante no caso do crescimento e ATP, com inibições de mais de 50% logo na primeira concentração de tóxico, um pouco diferente no caso do MTT, onde ocorre

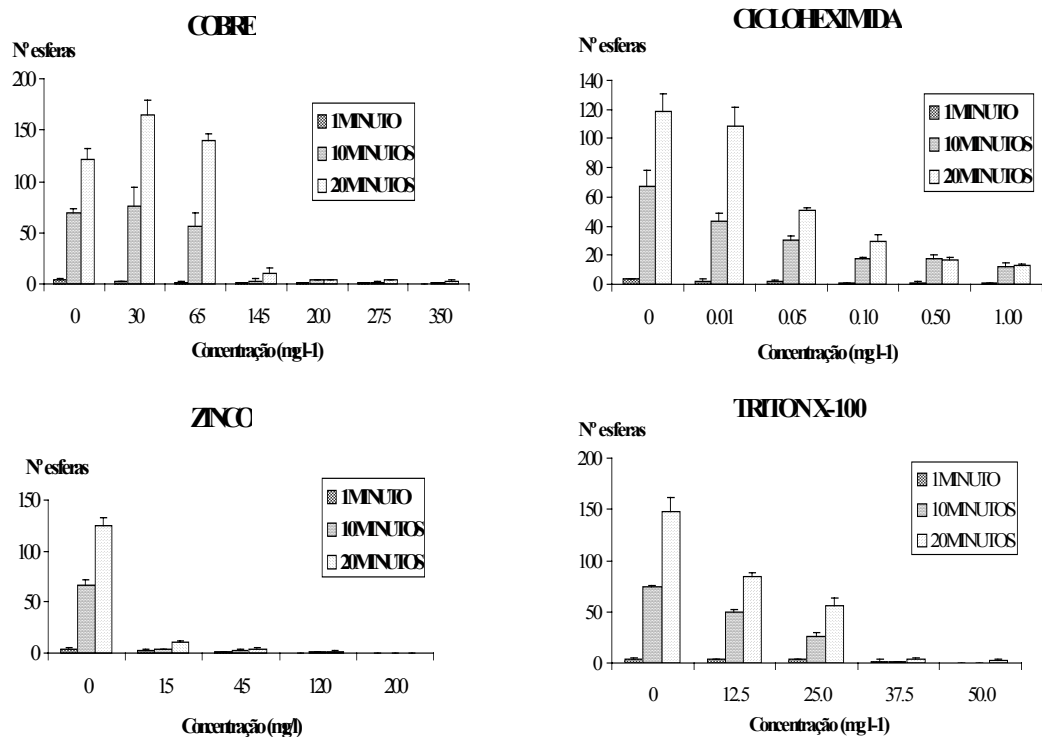
uma inibição mais gradual da primeira para a última das concentrações utilizadas e de novo uma estimulação com as duas concentrações mais baixas de cobre, no caso da ACP. A actividade da fosfatase ácida, estando intimamente ligada à actividade digestiva, não é de estranhar que tenha sido também estimulada, se bem que os tempos de experiência seja muito diferentes; o facto da estimulação da actividade da fosfatase ácida se prolongar ao longo das 48 horas, permite pôr em hipótese que a predação também seja estimulada a longo prazo.

Os resultados obtidos após exposição ao zinco, Triton X-100 e cicloheximida não diferem substancialmente dos primeiros, excepto no que diz respeito à estimulação: de um modo geral, concentrações crescentes dos tóxicos provocam inibições crescentes dos parâmetros estudados. Não foi observada mais nenhuma estimulação da predação, nem mesmo no caso do zinco (Figura 2). Foram realizados dois ensaios adicionais para testar este mesmo efeito com duas concentrações mais baixas de zinco (12,5 e 25 mg/L) mas não foi observada qualquer estimulação. Duas estimulações adicionais foram observadas após exposição de 48 horas à cicloheximida: a concentração mais baixa (0,0002 mg/L) provocou um aumento do teor em ATP e da actividade da fosfatase ácida; a segunda concentração (0,001 mg/L) somente estimulou a actividade da fosfatase ácida. Não foi encontrada nenhuma explicação para estas duas últimas observações.

A Tabela 2 apresenta os coeficientes de correlação entre os vários parâmetros estudados, excepto no que diz respeito à predação, porque os tempos a considerar são completamente diferentes. Só é apresentada a correlação da mortalidade (MOR) com o resultado do ensaio do MTT porque as correlações com o ATP e a ACP foram muito semelhantes. A cicloheximida não causou mortalidade significativa em qualquer das concentrações no período de tempo estudado. Como se pode observar, e de acordo com o esperado, a correlação do MTT com a mortalidade é sempre negativa, mas muito baixa nas primeiras 24 horas, tornando-se mais forte só às 48 horas. Isto acontece porque quer a mortalidade, quer as diferenças entre os resultados para as várias concentrações, no que diz respeito aos ensaios bioquímicos, só se tornam importantes neste período de tempo.

No que diz respeito às correlações entre os restantes parâmetros, o zinco e o Triton X-100 apresentam valores sempre acima dos 80%, excepto num caso, o que demonstra que as funções biológicas avaliadas foram afectadas de modo muito semelhante por estes dois compostos.

No caso do cobre, a estimulação da predação e da actividade da fosfatase ácida pelas duas concentrações mais baixas de cobre veio afectar os valores das correlações dos vários parâmetros, sobretudo os que reflectem a correlação entre ACP e crescimento ou ACP e ATP. Estes dois parâmetros, como acima se viu (Figura 1) apresentam uma forte inibição logo desde as primeiras concentrações de cobre e correlacionam-se por valores acima dos 90% no período das 48 horas. As correlações para as primeiras 24 horas são elevadas pois, como já se referiu, as diferenças entre os resultados não são ainda muito importantes.



**Figura 2** – Número de microesferas ingeridas por 30 indivíduos de *Tetrahymena pyriformis* expostos a diferentes concentrações de tóxicos, ao longo de 20 minutos. Os valores apresentados correspondem às médias e desvios-padrão de três ensaios independentes.

Os resultados dos ensaios com cicloheximida são mais difíceis de interpretar devido às duas estimulações observadas e já atrás referidas (no teor em ATP, para a concentração de 0,0002 mg/L e na actividade da fosfatase ácida, para as concentrações de 0,0002 e 0,001 mg/L). Por outro lado, as correlações entre crescimento e resultados dos ensaios bioquímicos só podem ser feitas para as concentrações comuns aos dois tipos de ensaios: 0,0002; 0,001 e 0,01 mg/L. De um modo geral, as correlações entre MTT, ATP e ACP são bastante elevadas, apesar das estimulações referidas. As correlações destas com o crescimento já são muito baixas, o que é explicado pelo facto de 0,0002 mg/L inibir mais de 75% do crescimento nas 48 horas, mas só inibir as respostas dos ensaios bioquímicos em menos de 20%, e as concentrações de 0,001 e 0,01 mg/L inibirem completamente o crescimento nas 48 horas e só inibirem a ACP, ATP e MTT entre 20 e 40% (resultados não apresentados). A cicloheximida não afecta, assim, os vários parâmetros fisiológicos avaliados do mesmo modo. Sabe-se que é um inibidor da síntese proteica no citoplasma dos eucariontes, e também da síntese proteica ao nível dos ribossomas mitocondriais, mas com diferentes extensões (Millis e Suyama, 1972). Foi também apontada por diversos autores a possibilidade de recuperação dos efeitos da cicloheximida por parte de *Tetrahymena* ainda na presença deste composto até a uma concentração de 0,2 mg/L e durante as três primeiras gerações (Heyer e Frankel, 1972); a partir da terceira geração, é referida uma notável perda da resistência até que, a partir

da sétima ou oitava geração, ela desaparece completamente. No presente estudo, e tendo em conta que o tempo de geração da estirpe usada foi calculado em 4,85 horas, em PYY, a 20°C (Nicolau *et al.*, 1999), não foi possível observar qualquer recuperação, mas o facto da cicloheximida inibir de diferentes modos a síntese proteica a nível do citoplasma e a nível dos ribossomas mitocondriais, e de ser possível a recuperação inicial do seu efeito inibidor, pode contribuir para a disparidade dos efeitos avaliados no presente trabalho.

**Tabela 2** – Coeficientes de correlação entre os conjuntos de dados obtidos para cada parâmetro avaliado, excepto a predação.

<u>COBRE</u>	1/24/48 H	1/24 H	48 H	<u>CICLO.</u>	1/24/48 H	1/24 H	48 H
MTT/ATP	0,896	0,962	0,847	MTT/ATP	0,958	0,700	0,944
MTT/ACP	0,863	0,967	0,791	MTT/ACP	0,995	0,744	0,994
ATP/ACP	0,675*	0,989	0,467*	ATP/ACP	0,968	0,983	0,928
CRE/MTT	0,875	0,928	0,849	CRE/MTT	0,580*	0,428*	-0,987
CRE/ATP	0,969	0,832	0,993	CRE/ATP	0,587*	0,512*	-0,176*
CRE/ACP	0,605*	0,854	0,471*	CRE/ACP	0,562*	0,513*	-0,104*
MOR/MTT	-0,300*	-0,282*	-0,736	MOR/MTT	n.d.	n.d.	n.d.
<u>ZINCO</u>	1/24/48 H	1/24 H	48 H	<u>TRITON</u>	1/24/48 H	1/24 H	48 H
MTT/ATP	0,862	0,985	0,831	MTT/ATP	0,991	0,971	0,989
MTT/ACP	0,936	0,960	0,896	MTT/ACP	0,997	0,961	0,989
ATP/ACP	0,879	0,931	0,850	ATP/ACP	0,985	0,995	0,969
CRE/MTT	0,830	0,822	0,810	CRE/MTT	0,901	0,901	0,864
CRE/ATP	0,967	0,850	0,999	CRE/ATP	0,889	0,896	0,810
CRE/ACP	0,817	0,673*	0,834	CRE/ACP	0,918	0,898	0,908
MOR/MTT	-0,536*	-0,569*	-0,927	MOR/MTT	-0,151*	-0,364*	-0,864

\* Valores com correlações, positivas ou negativas, inferiores a 70%.

O “stress” pode ser definido como qualquer factor que perturbe as células e é geralmente detectado através do decréscimo da taxa de proliferação celular ou mesmo da ausência de proliferação. A detecção dos efeitos do “stress” através de ensaios de mortalidade e crescimento pode ser morosa e tecnicamente exigente. A utilização de outro tipo de ensaios, como os sugeridos neste trabalho, pode ter vantagens económicas importantes por serem de mais fácil e rápida execução. O ensaio de predação é, sem dúvida, o mais fácil e rápido teste de avaliação de toxicidade dos seis ensaios apresentados. Os seus resultados são fiáveis e, de um modo geral, reflectem os



resultados dos outros ensaios, com a vantagem de poderem ser realizados em apenas 20 minutos. De qualquer modo, mesmo os testes de crescimento e/ou mortalidade não exigem a perícia técnica ou as despesas associadas a alguns dos ensaios padrão levados a cabo por algumas agências e/ou entidades oficiais para a determinação dos efeitos tóxicos de certos compostos sobre níveis tróficos elevados, como por exemplo, os peixes.

Hutner e Marcus (1987) demonstraram que o modo como *Tetrahymena* reagia aos factores de “stress” permitia entender a fisiologia celular inerente à reacção aos mesmos factores em mamíferos. Neste caso, contudo, estudos estruturais e/ou bioquímicos, são essenciais para a determinação do alvo do tóxico a nível celular. Neste sentido, *Tetrahymena* revela ser um organismo-teste muito conveniente (Nilsson, 1989).

Por outro lado, nos últimos anos, o potencial dos protozoários como indicadores biológicos da poluição tem sido valorizado nos ambientes aquáticos (Le Dû *et al.*, 1993; Pauli *et al.*, 1993) e na indústria (Benitez *et al.*, 1994). Os resultados obtidos neste trabalho encorajam pesquisas futuras dos padrões de respostas a outros compostos tóxicos, de modo a saber-se se será possível caracterizar as respostas de *Tetrahymena pyriformis* a tóxicos ou a grupos de tóxicos. No caso do cobre, a estimulação da predação e da actividade da fosfatase ácida não é seguida pelos outros parâmetros; esta característica, já referida por outros autores, pode contudo ser de extrema importância na detecção deste tóxico em acções de monitorização ambiental.

## AGRADECIMENTOS

A. Nicolau e N. Dias são bolseiras do Programa Praxis XXI, respectivamente BD/5080/95 e BD/20328/99. Este estudo foi financiado pelo projecto Praxis XXI (2/2.1/BIO/1118/95).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benitez, L., Martin-Gonzalez, A., Gilardi, P., Soto, T., Rodriguez de Lecea, J. and Gutiérrez, J. C., 1994. The ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* as a biosensor to detect micotoxins. *Lett. Appl. Microb.*, **19**, 489-491.

Dias, N., Nicolau, A., Carvalho, G. S., Mota, M. e Lima, N., 1999. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *J. Basic Microbiol.*, **39**, 103-108.

Fenchel, T., 1980. Suspension feeding in ciliated protozoa: functional response and particle size selection. *Microb.Ecol.*, **6**, 1-11.

Heyer, C. B. e Frankel, J., 1972. The kinetics of resensization of *Tetrahymena* following recovery from effects of cycloheximide. *J. Cell Physiol.*, **78**, 411-418.

Hutner, S. H. e Marcus, S. L., 1987. Protozoological approaches to the celular basis of mammalian stress repair. *Int. Ver. Cytol.*, **100**, 371-425.

Le Dû, A., 1993. Modulation of copper toxicity by the chemical parameters of river water. *Fresenius Envir. Bull.*, **2**, 629-634.

Madoni, P., 1994. *La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi. Manuale di applicazione.* Azienda Gas Acqua Conzorziale di Reggio Emilia / Università degli Studi di Parma.

Madoni, P., Davoli, D. e Gorbi, G., 1992. Acute toxicity of cadmium, copper, mercury and zinc to ciliates from activated sludge plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 900-902.

Millis, A. e Suyama, Y., 1972. Effects of chloricofenicol and cycloheximide on the biosynthesis of mitochondrial ribosomes in *Tetrahymena*. *J. Biol. Chemistry*, **247**, 4063-4073.

Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.

Nicolau, A., Mota, M. e Lima, N., 1999. Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to copper, zinc, cicloheximide and Triton X-100. *FEMS – Microbiology Ecology, in press.*

Nilsson, J. R., 1981. Effects of copper on phagocytosis in *Tetrahymena*. *Protoplasma*, **109**, 359-370.

Nilsson, J. R., 1989. *Tetrahymena* in Citotoxicology: with special reference to the effects of heavy metals and selected drugs. *Europ. J. Protistol.*, **25**, 2-25.

Pauli, W., Berger, S., Jaskulka, L. and Schmitz S., 1993. A case for the inclusion of a protozoan test in aquatic toxicity assessment using *Tetrahymena*. *Sci. Total. Environ.*, **Suppl.**, 779-786.

Wakatsuki, T., Takasi, Y., and Imahara, H., 1986. Respiratory inhibition by copper in *Tetrahymena pyriformis* GL. *J. Ferment. Tecyhnol.*, **64**, 119-127.