



KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIAI TESZTEK TALAJRA

Gruiz Katalin

Molnár Mónika

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

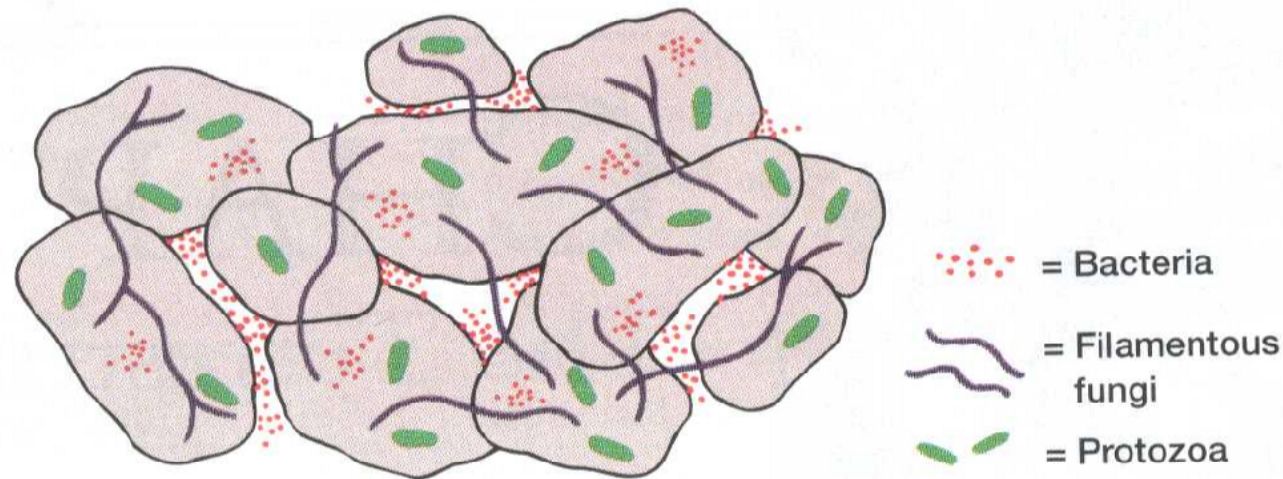
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



A környezettoxikológia helye és szerepe

- **A környezettoxikológia** a vegyi anyagoknak az ökológiai rendszerek szerkezetére és funkciójára gyakorolt hatását vizsgálja. Az embert az ökológiai rendszer részeként kezeli.
- **Az ökológiai rendszereket** teljes komplexitásában átfogja, a molekuláris szinttől az egyed és a közösség szintjén keresztül a teljes ökoszisztémáig.
- **Multidiszciplináris**, egy sor szakterület együttműködésére alapoz.
- A környezettoxikológia eredményei **használhatóak** egyes vegyi anyagok valamint szennyezett területek kockázatának jellemzésére, támogatják a környezetmenedzsment és környezetpolitika döntéseit.
 - Hatáson alapuló határértékek és más környezetminőségi kritériumok képzéséhez
 - Monitoringrendszerek tervezéséhez
 - Kockázatcsökkentési intézkedésekkel kapcsolatos döntésekhez

A talaj komplex rendszere



A talaj komplex élő, dinamikus rendszer. A szennyezett talaj még az ép talajnál is összetettebb, ahol a talaj háromfázisú szervetlen-szerves kolloid mátrixával nemcsak a fajok százait és egyedek milliárdjait magában foglaló talajmikroflóra, de a komponensek akár százait is tartalmazó **szennyezőanyag** is kölcsönhatásba lép.

Vegyianyagok viselkedése a környezetben

Vegyianyagok sorsa és viselkedése a környezetben: mozgékonyág, hozzáférhetőség, biodegradálhatóság befolyásolják az aktuális toxicitást

Integrált megközelítés: fizikai-kémiai jellemzők + biológiai-ökotoxikológiai jellemzők **helyszínspecifikus kockázat.**

Mozgékonyág, hozzáférhetőség befolyásolja az aktuális toxicitást: kölcsönhatás a szennyezőanyagok, valamint a szennyezőanyag és a mátrix között. Transzport és hozzáférhetőség integrált metodikával jellemezhető.

Szorpciós kapacitás: a szennyezőanyag és toxicitása megoszlik környezeti elemek fázisai között : kilúgzás, deszorpció, párolgás.

Vegyianyagok viselkedése a környezetben

A toxicitás megoszlása a talaj szilárd-víz, valamint szilárd-gáz fázisai között kockázatot jelent a felszín alatti vízre és a levegőre. Üledékek esetében a szilárd fázis és a pórusvíz közötti megoszlás a felszíni víz minőségét veszélyezteti.

Erős kötődés és rossz biodegradálhatóság a kémiai időzített bomba jelenségéhez vezet.

Az **aktuális toxicitást** (az ökoszisztémában realizálódó hatást) szilárd fázisú minták és adszorbeált szennyezőanyag esetében a **direkt kontakt vagy interaktív** tesztek jellemzik megfelelően, ahol megnyilvánulhatnak a kölcsönhatások. Ezek eredményei magukban foglalják az összes komponens közötti kölcsönhatást: szennyezőanyagok, szennyezett közeg, organizmus(ok).

Szennyezett talaj ökotoxikológiai tesztelése (1)

Környezeti minták tesztelésének problémái:

- Szennyezőanyagok keveréke
- Kölcsönhatások: szennyezőanyagok, mátrix és a biota között
- Vizsgált közeg: extraktum, teljes talaj

Szennyezett talaj tesztelésének problémái

- Szennyezőanyag keverék: szinergizmus, antagonizmus
- Biotranszformáció: termékek hatása
- Biodegradáció
- Hozzáférhetőség: eltérő fizikai-kémiai és biológiai hozzáférhetőség
- Az analitikai program csak a szennyezőanyagok kis hányadát tartalmazza
- A környezeti minta biotikus és abiotikus tulajdonságai befolyásolják az eredményt

Szennyezett talaj ökotoxikológiai tesztelése (2)

Az ökotoxikológiai tesztelés megoldás a problémák egy részére

- Integrálja a toxikus anyagok kölcsönhatásait
- Integrálja a szennyezőanyag és a mátrix kölcsönhatásait
- A szennyezőanyag biológiailag hozzáférhető részét méri
- Kémiai analitikai módszerrel nem kimutatható anyagok hatását is méri
- Az analitikai programba be nem vett veszélyes anyagok hatását is méri

Ökotoxikológiai tesztekkel szemben támasztott követelmények

- Ökológiai relevancia, környezeti realitás
- Reprodukálhatóság
- Megbízhatóság
- Érzékenység

Ökotoxikológiai tesztek osztályozása

▪ Fajok száma szerint

- Egy fajt alkalmazó teszt
- Több fajt alkalmazó

▪ A tesztorganizmus

- Baktérium
- Alga
- Gomba
- Növény
- Állat
- Több faj együtt

▪ Tesztelendő ökoszisztéma

- Vízi ökoszisztéma
- Szárazföldi ökoszisztéma

▪ Expozíciós scenárió

- Teljes test
- Etetési kísérletek
- Ismert mennyiség beinjektálása (intramuszkuláris, intravénás)
- Kontrollált mennyiség gyomorba juttatása

Ökotoxikológiai tesztek osztályozása

A vizsgált környezeti elemek és fázisok

- Víz és pórusvíz
- Extraktumok, eluátumok, csurgalékok, stb.
- Szilárd fázisú minták: teljes talaj, teljes üledék

Az ökotoxikológiai tesztelés célja

- Vegyi anyagok toxicitásának, mutagenitásának és teratogenitásának vizsgálata,
- Hatáson alapuló környezetminőségi kritériumok képzése
- Biomonitoring (integrált monitoring)
- Korai figyelmeztető rendszerek
- Környezeti minták toxicitásának, mutagenitásának és teratogenitásának vizsgálata
- Keverékek, hulladékok toxicitásának, mutagenitásának és teratogenitásának vizsgálata
- Közvetlen, hatáson alapuló döntési rendszerek

Ökotoxikológiai tesztek osztályozása

▪ **Teszt időtartama**

- Rövid idejű = akut
- Hosszú idejű = krónikus

▪ **Teszt típus**

- Laboratóriumi teszt (bioassay): akut, krónikus toxicitás, mutagenitás, teratogenitás
- Mikrokozmosz, mezokozmosz (több fajt alkalmazó toxicitási teszt)
- *In situ* biomonitoring (aktív, passzív)
- Diverzitás
- Biodegradációs
- Bioakkumulációs.

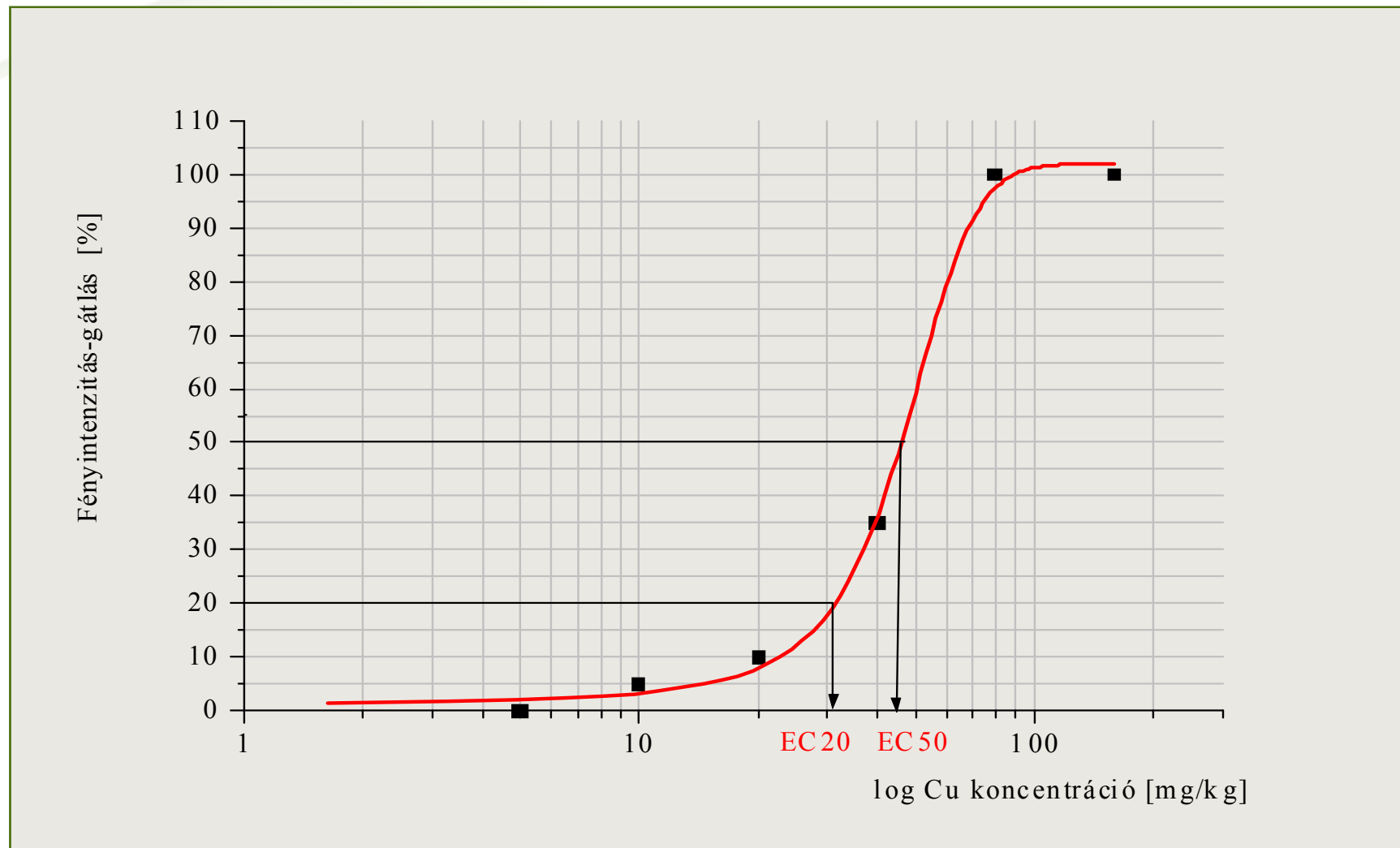
▪ **Leggyakoribb mérési végpontok**

- Toxicitási tesztek: növekedés (sejtszám, tömeg, gyökérhossz, klorofill tartalom), túlélés, halál, immobilizáció, légzés: O₂ fogyasztás, CO₂ termelés, enzimaktivitások, ATP termelés, szaporodás, lumineszkálás etc.
- Mutagenitási teszt: mutánsok száma, revertánsok száma, kromoszóma hibák
- Rákkeltő hatás: tumorok
- Teratogenitási teszt: reprodukтивitás, cytogenetikai jellemzők
- Biodegradációs tesztek: O₂ fogyasztás, szubsztrátfogyás, termékképzés, CO₂ termelés
- Bioakkumulációs tesztek: az akkumulált vegyi anyag kémiai analízise

Koncentráció (dózis) – válasz összefüggés tesztelése

- **A mérés végpontja** biokémiai, fiziológiai, viselkedési, populációs, közösségi jellemzők és ökoszisztéma hatások
- **A teszt kiértékelésekor kapott végpont** A jellemző koncentrációt a koncentráció (dózis) – hatás görbéről olvassuk le: az értékelés mindig statisztikai / grafikus
 - **EC₂₀, EC₅₀** (Effective Concentration)
 - **ED₂₀ / ED₅₀** (Effective Dose)
 - **LC₂₀ / LC₅₀** (Lethal Concentration)
 - **LD₂₀ / LD₅₀** (Lethal Dose)
 - **NOEC / NOEL** (No Observed Effects Concentration / Level)
 - **NOAEC / NOAEL** (No Observed Adverse Effects Concentration / Level)
 - **LOEC / LOEL** (Lowest Observed Adverse Effects Concentration / Level)
 - **MATC** (Maximum Allowable Toxicant Concentration)
 - **NOEC < MATC < LOEC**

Koncentráció-válasz összefüggés



Akut toxicitás - végpontok

Akut toxicitás mérése esetén (rövid idejű kitettség) a koncentráció – hatás görbéről leolvashatjuk a 10, 20 50 vagy 90 %-os gátlást okozó koncentrációt

LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} , LC_{90} = letális koncentráció (Lethal Concentration), mely a teszt-organizmus 10, 20, 50 vagy 90 %-ának pusztulását okozza.

EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{90} = hatásos koncentráció (Effect Concentration), mely a mérési vagy vizsgálati végpont 10, 20, 50, 90 %-os csökkenését okozza.

LD_{10} , LD_{20} , LD_{50} , LD_{90} = letális dózis (Lethal Dose), mely a tesztorganizmus 10, 20, 50 vagy 90 %-ának pusztulását okozza.

ED_{10} , ED_{20} , ED_{50} , ED_{90} = hatásos dózis (Effect Dose), mely a végpont 10, 20, 50, 90 %-os csökkenését okozza.

Krónikus toxicitás - végpontok

Krónikus toxicitás vizsgálatából , a koncentráció-hatás görbe alapján grafikusán, vagy statisztikai módszerekkel meghatározott értékeket szokták megadni:

NOEC = (No Observed Effects Concentration), az a legnagyobb koncentráció, amelynek nincs megfigyelhető hatása.

NOEL = (No Observed Effects Level Concentration), az a legnagyobb dózis, amely nem okoz megfigyelhető hatást.

NOAEC = (No Observed Adverse Effects Concentration), az a legnagyobb koncentráció, amely még nem okoz megfigyelhető káros hatást.

NOAEL = (No Observed Adverse Effects Level), az a legnagyobb dózis, amely még nem okoz megfigyelhető káros hatást.

LOEC = (Lowest Observed Effects Concentration) az a legkisebb koncentráció, amelynek hatása már megfigyelhető.

LOEL = (Lowest Observed Effects Level) az a legkisebb dózis, amelynek hatása már megfigyelhető.

MATC = (Maximum Allowable Toxicant Concentration), a szennyezőanyag maximális, még megengedhető koncentrációja.

Ökotoxikológiai tesztek statisztikai értékelése

Akut toxicitási tesztek értékelése

Grafikus interpoláció

Probit analízis

Logit módszer

Mozgó átlag

Szoftverek

TOXSTAT

SAS-PROBIT

SPSS-PROBIT

DULUTH-TOX c

Krónikus toxicitási tesztek értékelése

ANOVA: variancia analízis: annak a koncentrációnak a meghatározása, amely szignifikánsan eltér a kezeletlen kontrolltól

Több fajt alkalmazó tesztek értékelése

Az ökológiai adatokban fellelhető összefüggések megtalálása többváltozós matematikai módszerekkel.

PCA: principal components analysis (linearitás feltételezett)

DPC: Detrended Principal Components

NMDS: Nonmetric Multidimensional Scaling

RDA: PCA + redundancia analízis

Cluster analízis: hasonlóság alapján történő csoportosítás

NCAA: Nonmetric Clustering and Association Analysis: mesterséges intelligencia többváltozós változata

A tesztorganizmus: általános követelmények

1. Hozzáférhetőség: a tesztorganizmus széles körben elérhető legyen

- Laboratóriumi kultúra
- Más kultúrák, törzsgyűjtemények
- Gyűjtés szabadföldről

2. Fenntartás

- Laboratóriumban fenntartható legyen
- Nagy mennyiségben elérhető, beszerezhető legyen

3. A tenyészet genetikai tulajdonságai

- Ismert genetikai összetétel
- Ismert genetikai történet (norvég patkány, *Escherichia coli*)

4. Érzékenysége

- Relatív érzékenység a toxikus szennyezőanyagra
- Speciális érzékenység egy vagy több szennyezőanyagra

A tesztorganizmus: általános követelmények

5. Mennyire reprezentálja az ökoszisztémát

- Érzékenysége legyen jellemző rendszertani egységére
 - Lehet a legérzékenyebb
 - Érzékenyebb, mint az ökoszisztéma átlaga
 - “átlagos” érzékenységű
- Milyen rendszertani egységet (család, stb.) reprezentál

6. Koncentráció - válasz összefüggés

- A válasz legyen arányos a toxikus anyag koncentrációjával
- A hatásos koncentrációtartomány széles legyen

7. A teszt ismételhősége, statisztikája

Egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek - példák

- A szennyezőanyagok hatásának vizsgálatára széles körben használják a **bakteriális bioteszteket**. Népszerűségüket és elterjedésüket annak köszönhetik, hogy gyorsak, jól reprodukálhatóak, laboratóriumi körülmények között könnyen kivitelezhetők és kezelhetők. A vegyi anyagok mikroflórára gyakorolt hatását a gyakorlatban több eltérő vizsgálati végponttal követik (szaporodás-gátlás, enzimaktivitás-gátlás, biolumineszcencia-gátlás stb.).
- A **növényi tesztek** közül a magasabb rendű növényi tesztorganizmusokat alkalmazó eljárások terjedtek el szennyezett talaj tesztelésére. Vizuálisan is megfigyelhetőek, a tápláléklánc alapját képezik és egyes szennyezőanyagokra nagyon érzékenyek. A talajban található növényi gyökerek hatalmas, biológiailag aktív felületet jelentenek. A növényi tesztorganizmuskoknál a leggyakoribb végpont a csírázás-, a gyökér- és a föld feletti részek növekedésgátlásának a vizsgálata.
- A talajlakó **állati tesztorganizmusok** a talajjal, teljes testfelületükkel érintkeznek, ezért kitettségük igen nagy, fontos trófikus szintet képviselnek. Egysejtű és többsejtű állatot alkalmazó ökotoxikológiai tesztek számtalan leírása található a szakirodalomban. Ezen élőlények expozíciójának mértéke különböző élettani, életmódbeli tulajdonságaik és táplálékláncbeli helyük miatt jelentősen eltérő lehet.

Bakteriális tesztorganizmus

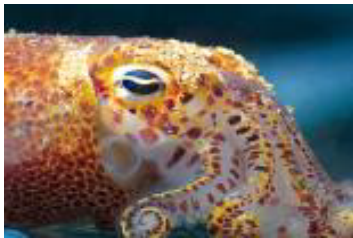
Vibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt

- Tesztorganizmus: *Vibrio fischeri* NRRLB – 11177

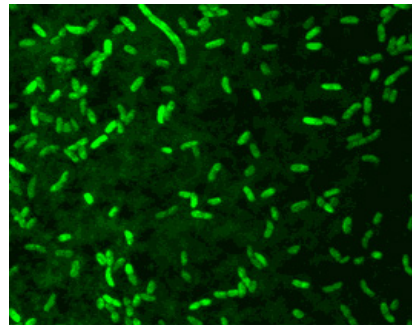
Tengeri baktérium, fényt emittál

A kurtafarkú tintahal hordozza a *Vibrio fischeri*-t az úgynevezett "fénszervben".

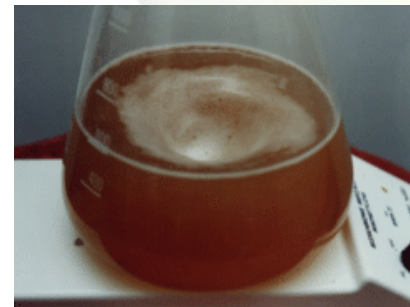
- A teszt elve a *Vibrio fischeri* által emittált lumineszcens fény detektálása; toxikus anyagok jelenlétében a fényemisszió csökken.



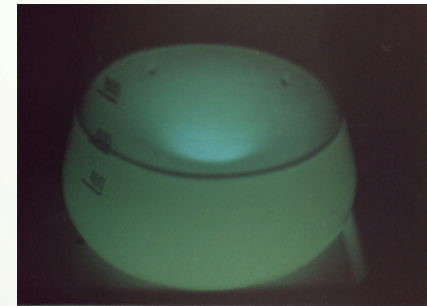
Kurtafarkú tintahal
Euprymna scolopes



Baktériumszuszpenzió
mikroszkópos képe
(fluoreszcens festett sejtek)



Folyadék kultúra
jól megvilágított
helyen

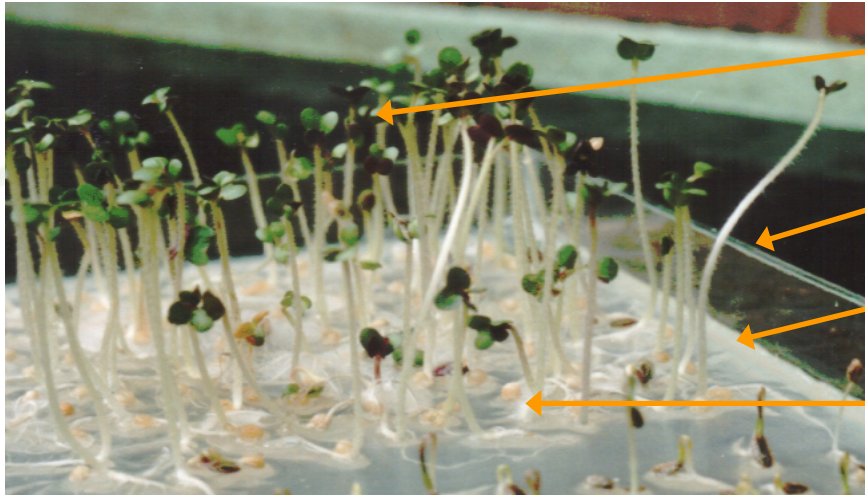


Folyadék kultúra
sötétben

Vibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt

- **Teszt típusa:** bakteriális, akut toxicitási teszt;
- **A *Vibrio fischeri* érzékenysége:** mind nehézfémekre, mind szerves makro- és mikroszennyezőkre érzékeny;
- **Végpont:** lumineszcencia intenzitáscsökkenése, a minta hígítási sorából EC_{20} , EC_{50} illetve ED_{20} , ED_{50} határozható meg;
- **Szükséges műszer:** luminométer;
- **Tesztelés időtartama:** 30 perc;
- **Alkalmazási terület:** előzetes és részletes állapotfelmérés, kockázatfelmérés, remediáció követése, utómonitoring.

Növényi biotesztek



Csíranövény

Üvegtálca

Agarral kevert talaj

Növényi gyökerek az agar felszínén

- Alkalmazott tesztnövények: fehér mustár (*Sinapis alba*), borsó (*Pisum sativum*), kerti zsázsa (*Lepidum sativum*), retek (*Raphynus sativus*), búza (*Triticum sativum*), zab (*Avena sativa*) és kukorica (*Zea mays*).
- A növényi magokat közvetlenül a talajba (v. agarral kevert talajba) ültetjük → direkt kontakt a növényi gyökerek és a talaj között.

Sinapis alba gyökér-, szárnövekedés gátlási teszt

- **Teszt típusa:** növényi, akut toxicitási teszt.
- **A *Sinapis alba* érzékenysége:** a szennyezőanyagok széles skálájára érzékeny.
- **Végpont:** szár és gyökérnövekedés gátlás százalékban megadva, vagy ED₂₀ és ED₅₀ a minták hígítási sorozatából.
- **Szükséges műszer:** vonalzó, vizuális értékelés.
- **Tesztelés időtartama:** 72 óra.

Állati tesztorganizmus

Folsomia candida mortalitási teszt

A *Folsomia candida* (*Collembola*) az ugróvillások rendjébe tartozó, ősi rovar. Apró (3-4 mm hosszú) fehér állatkák.

- Talajban élnek (m²-enként ~ 100 000 állatka)
- Fontos szerepük van a „talajfunkció” fenntartásában
- Hasi tömlővel lélegeznek, talajgőzökre érzékenyen reagálnak.

A vizsgálathoz azonos korú (14 napos) állatkák szükségesek



Kifejlett állat petékkel



Kifejlett egyedek fiatal állatokkal



Kifejlett *Collembola*

Folsomia candida mortalitási teszt

- **Teszt típusa:** állati, akut toxicitási és krónikus (reproduktivitási) teszt.
- **A *Folsomia candida* érzékenysége:** nehézfémekre kevésbé, szerves szennyezőanyagokra érzékeny, főleg az illékonyakra és a bőrön át felszívódókra.
- **Végpont:** hígításból LD₂₀ és LD₅₀, reprodukivitási tesztnél NOEC.
- **Szükséges műszer:** citoplaszt mikroszkóp vagy vizuális.
- **Tesztelés időtartama:** akut: 5-10 nap, reprodukciós: 20 nap.

IRODALOM

Környezettoxikológia

Vegyianyagok hatása az ökoszisztémára

Gruiz Katalin

Horváth Beáta

Molnár Mónika

Műegyetemi Kiadó, 2001

ISBN 963 420 676 x