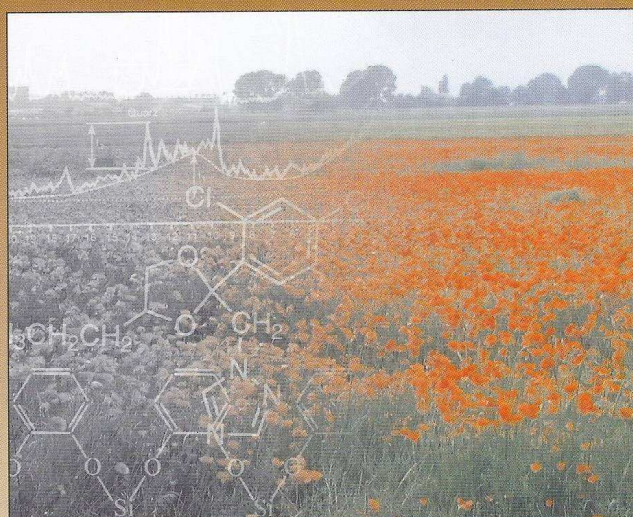


Gruiz Katalin
Horváth Beáta
Molnár Mónika

KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIA

Vegyianyagok hatása az ökoszisztémára



Műegyetemi Kiadó

*Gruiz Katalin
Horváth Beáta
Molnár Mónika*

KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIA

Vegyí anyagok hatása az ökoszisztémára



Műegyetemi Kiadó, 2001.

Lektor
Dr. László Elemér

© **Gruiz Katalin**
Horváth Beáta
Molnár Mónika

Azonosító: 65036

ISBN 963 420 676 x

**A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki Karának**
megrendelése alapján kiadja a
Műegyetemi Kiadó
Felelős vezető: Veress János
Terjedelm: 20,58 (A/5) ív
Nyomta és kötötte:
Műegyetemi Nyomda
Felelős vezető: Frigy Ottó
Munkaszám: 0199/01

Előszó

A környezettoxikológia a környezetbe került vegyi anyagoknak az ökoszisztéma tagjaira gyakorolt hatását méri és ebből igyekszik előrejelzést adni a teljes ökoszisztémára. Teljes ökoszisztémák minden részletére kiterjedő vizsgálat mai tudásunk és a költségek miatt nem lehetséges, ezért kiválasztott, jellemző fajok vagy laboratóriumi tesztorganizmusok válasza alapján következtetünk az ökoszisztéma egészére.

Az ökotoxikológiai vizsgálatok eredménye tehát eleve bizonytalanságot rejt magában, hiszen nem tudhatjuk, hogy a választott fajok valóban jól reprezentálják-e a teljes ökoszisztémát. Egy másik dilemma, mely a szakterület tudósait is megosztja, annak eldöntése, hogy a legérzékenyebb fajoktól kapott válaszokra alapozzunk-e, vagy az átlagosakra, hogy mindenütt azonos organizmusokat alkalmazzunk-e, vagy helyspecifikusakat.

Ez a könyv ismerteti a vegyi anyagok és a szennyezett környezeti minták ökotoxikológiai tesztelésére, felszíni víz, felszín alatti víz, talaj és üledék vizsgálatára alkalmas módszereket és azok elvi alapjait. A hangsúlyt a szilárd fázisú környezeti minták hatásának vizsgálatára helyezi, mert ez új és kevésbé ismert terület. A mikrobiális-, növényi- és állati tesztorganizmusok kívül kitér a mikro- és mezokozmoszok ismertetésére és a talajban élő összes organizmus tevékenységének eredőjeként megjelenő aktivitások mérésére és értelmezésére.

Bemutatja az ökotoxikológiai mérési eredmények felhasználhatóságát a szennyező vegyi anyagok ökoszisztémára gyakorolt hatásának és kockázatának mérésében, szennyezett területek állapotának felmérésében, a környezeti monitoringban, különös tekintettel vegyes és/vagy ismeretlen szennyezőanyagot tartalmazó területek esetére. A lehető legtágabb összefüggésekben tárgyalja az ökotoxikológia szerepét, bemutatva az eredmények hasznosítását a korszerű környezetirányításban és a környezetpolitikában, a környezeti minőségi kritériumok, a határértékek képzésben, a kockázatcsökkentésre irányuló döntések meghozatalában, környezetvédelmi technológiák kiválasztásában, a remediáció célértékének meghatározásában, a környezeti állapot és környezetvédelmi technológiák követésében és minősítésében.

A környezet állapotát, az ökoszisztéma kitettségét és érzékenységét vizsgálva, csak akkor kaphatunk megbízható és összehasonlítható eredményeket, ha szabványosított módszereket és tesztorganizmusokat használunk. A tesztmódszereket és a tesztorganizmusokat akkor tudjuk értelmesen, az elérendő céllal harmóniában alkalmazni, ha egységes szemlélet, tisztázott tudományos alapok és megfelelő adatértékelési módszerek állnak rendelkezésünkre. Ehhez igyekszik segítséget nyújtani ez a könyv, mind a környezetvédelmet tanuló egyetemi hallgatóknak, mind pedig a gyakorló szakembereknek.

1. Környezettóxicológia és kockázatkezelés

1.1. Vegyi anyagok hatása a környezetre

A környezetünkbe kerülő vegyi anyagok az ökoszisztéma szerkezetére és funkciójára, ezen keresztül pedig az emberre isveszélyt jelentenek. A környezeti toxikológia a vegyi anyagok káros hatását hivatott kimutatni, annak ellenére, hogy sem ökoszisztémára sem az emberre gyakorolt hatást nem tudja közvetlenül mérni.

A környezetünket terhelő vegyi anyagok globálisan jelentkező problémát okoznak. A természetidegen vegyi anyagokon, a xenobiotikumokon kívül az is káros, ha a természetes eredetű szerves és szervetlen vegyi anyagok a megszokottól eltérő eloszlásban terhelik a környezetet, ha extrém nagy értékek kerülnek a földi anyagforgalomba.

Egy vegyi anyag veszélyessége kémiai szerkezetéből adódó immanens tulajdonság. Egy vegyi anyag akkor is veszélyes, ha zárt üvegben áll a laboratórium polcán, vagy ha még csak a molekulát tervező vegyész mérnök számítógépében szerepel. A vegyi anyag kockázata viszont, a környezettel való kölcsönhatása révén nyilvánul meg.

Egy vegyi anyagnak az emberre gyakorolt káros hatását nem vizsgálhatjuk úgy, mint egy tesztorganizmus esetében, nem vizsgálhatjuk a vegyi anyag különböző koncentrációinak hatását statisztikailag megalapozott egyedszámú kísérleti csoporton és eltérő populációkon, hogy a vizsgálat eredménye megmutassa számunkra, hogy mekkora az a koncentráció, amely még nem hat károsan az emberre.

Hasonlóan az emberhez, az ökoszisztéma esetében sem lehet ugyanazt vagy „azonos” ökoszisztémákat kitenni egy vizsgálandó vegyi anyag különböző koncentrációinak és ebből értékelni a teljes ökoszisztémára gyakorolt koncentrációfüggő hatást, figyelembe véve az ökoszisztéma valamennyi összetevőjét és kölcsönhatását. Azért sem tudjuk ezt tenni, mert az ép, egészséges ökoszisztéma működését és szerkezetét sem ismerjük tökéletesen.

Vegyi anyagoknak az emberre és az ökoszisztémára gyakorolt hatásaira a toxikológiai illetve ökotoxikológiai tesztek eredményéből következtetünk. Az emberre gyakorolt hatást az emberi anyagcserével hasonlóságot mutató, jól bevált tesztorganizmusok eredményei alapján, extrapolációval határozzuk meg.

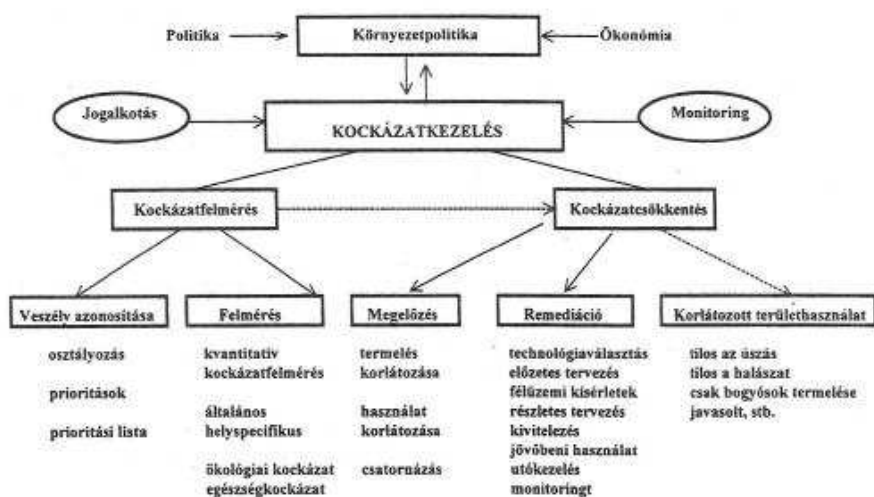
A vegyi anyagok ökoszisztémára gyakorolt káros hatását vizsgálja az ökotoxikológia, különböző szintű és eltérő elveken alapuló módszerekkel. Ezek eredményeiből szintén extrapolálással kapjuk meg a teljes ökoszisztémára érvényes eredményt.

Az ökotoxikológia a vizsgálat céljától függően az ökológiai rendszerek bármely szintjének vizsgálatát célozhatja, a molekuláris szinttől az egyed és a közösségek szintjén keresztül a teljes ökoszisztémáig.

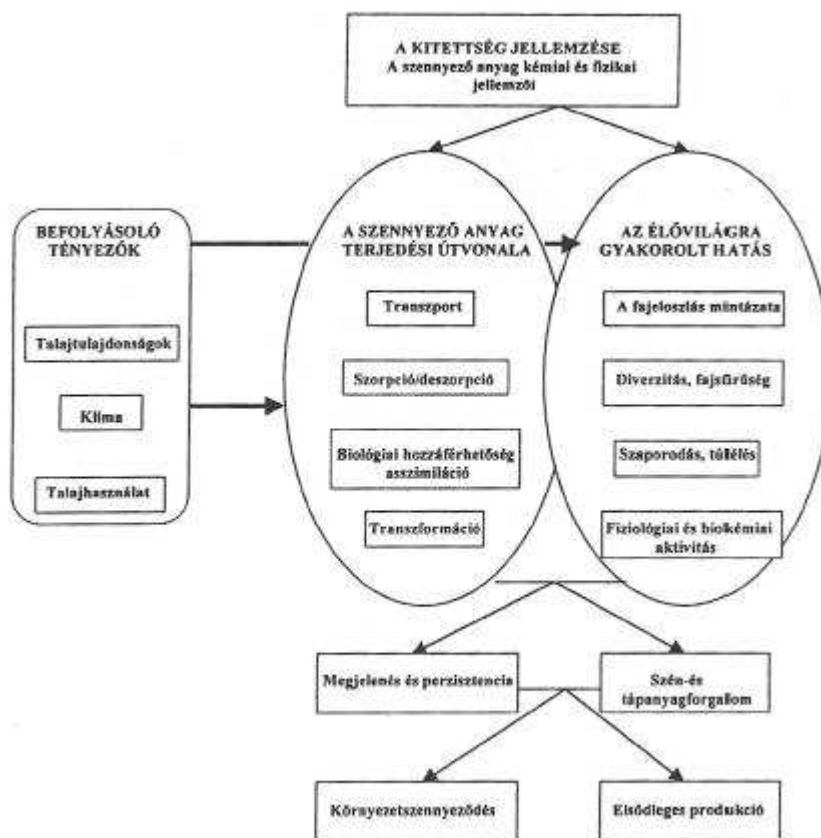
A humán toxikológus a kísérleti állatba bejutott vegyi anyag mennyiségét (dózist) vagy belégzés esetén a belégtett levegő szennyezőanyag koncentrációját veszi alapul az emberre károsan még nem ható dózis vagy koncentráció meghatározásához. Az ökotoxikológus minden esetben a vegyi anyag környezeti koncentrációjából indul ki.

A környezettóxicológia a vegyi anyagok környezeti kockázatának meghatározásához szükséges alapvető adatokat szolgáltatja, vagyis a vegyi anyag hatására vonatkozó információkat. A vegyi anyag hatásán, a dózis-válasz illetve a koncentráció válasz összefüggés ismerete alapján meghatározható károsan még nem ható környezeti koncentráción kell alapulniuk a környezeti minőségi kritériumoknak, a határértékeknek is.

A vegyi anyagok környezeti kockázatának számszerűsített értéke minden környezetvédelemmel, környezetgazdálkodással kapcsolatos valamint irányítási és politikai döntés tudományos alapját adja.



1. ábra: Ökotoxikológia szerepe a környezetvédelem feladataiban (Gruiz, 1997)



2. ábra: A környezeti kockázat és az ökotoxikológiai tesztelés összefüggései (Torstensson, 1994)

A környezeti kockázat felmérése és benne a környezettoxicológia multi-diszciplináris tudomány. A teljesség igénye nélkül felsoroljuk azokat a tudományterületeket, melyek közreműködésére szüksége van a környezeti toxikológiának:

Ökológia	Talajtudományok
Biológia, populáció biológia	Meteorológia
Mikrobiológia	Tengerbiológia, oceanográfia
Biokémia	Természetvédelem, tájvédelem
Fiziológia	Matematika, számítástechnika, modellezés
Molekuláris genetika	Biometria
Farmakokinetika	Kockázatfelmérés
Evolúcióbíológia	Kockázatkezelés
Szerves és szervetlen kémia	
Limnológia	

Az ökológia a legfontosabb alap, amely megadja a fajok kölcsönhatását az ökoszisztémában és a toxikus vegyi anyag hatását egy bizonyos ökoszisztéma felépítésére és működésére. A teljes ökoszisztémához képest a másik véglet a toxikus anyag molekuláris szintű hatása, mellyel a biológia és a farmakológia foglalkozik. A szerves és szervetlen kémia a biotikus és abiotikus kölcsönhatások leírásához szükséges. A biometria a biológiai folyamatok mennyiségi leírásával, méréssel, statisztikai módszerek alkalmazásával és a feltevések ellenőrzésével foglalkozik. A matematika, a számítástechnika a modellezés az előrejelzéshez, az extrapolációhoz szükséges. Az evolúcióbiológia a fajok változékonyságát, a vegyi anyag hatására bekövetkező adaptációt hivatott vizsgálni, és lehetőleg megkülönböztetni a klimatikus és szezonális változásoktól. A mikrobiológia és a molekuláris genetika segít a szennyező vegyi anyagok környezetbeli sorsának, átalakulásainak, az elemkörforgásba való bekapcsolódásának leírásában, a bontható vegyi anyagok degradálásának, átalakításának, hatástalanításának tervezésében, a környezet „meggyógyításában”, a remediációban. A kockázatelemzés az a keret, az az útmutató, amely elhelyezi a környezettoxicológiát a környezetirányítási rendszerben, meghatározza szerepét a kockázatelemzésben és kockázatkezelésben, hogy hol és milyen környezettoxicológiai adatokra lehet szükség, és hogy milyen irányba kell a módszereket fejleszteni.

1.1.1. A környezettoxicológia alapjai

A vegyi anyagok hatásának megértéséhez érdemes a folyamatot három további lényeges lépésre bontani.

1. A vegyi anyag környezetbe kerülése után kölcsönhatásba lép a környezettel. Terjed, megoszlik a különböző fázisok között, átalakul, degradálódik, stb. Ezek a folyamatok határozzák meg a vegyi anyag környezeti koncentrációját, azt, amely eléri a biota tagjait és hat rájuk.
2. A vegyi anyag kölcsönhatásba lép az élőlény egy aktív helyével, melyet molekuláris szinten kell értelmeznünk. A hatás molekuláris szinten lehet egy élőlény életfontosságú szerkezeti eleme vagy valamely fontos szereppel bíró molekulája, pl. enzimfehérje, nukleinsav vagy membránreceptor.
3. A molekuláris szintű kölcsönhatás eredményeképpen magasabb szintekre is áttevődik és megjelenik a hatás, pl. biokémiai vagy fiziológiai szinten, a viselkedés szintjén, a populáció, a közösség vagy az egész ökoszisztéma szintjén.

A vegyi anyag környezetbe kerülése

A vegyi anyag fiziko-kémiai és kémiai tulajdonságai alapvetően megszabják a molekuláris szintű kölcsönhatásokat. A vegyi anyag kémiai szerkezetének megjelenését a megfigyelt hatásban QSAR-nak (Quantitative Structure - Activity Relationship = mennyiségi összefüggés a szerkezet és az aktivitás között) nevezzük. A QSAR lehetővé teszi, hogy a toxikológusok pusztán a kémiai szerkezet alapján előre jelezzék a vegyi anyag környezetbe kerülésének következményeit.

A vegyi anyag sorsát a környezetben alapvetően befolyásolja a szerkezet. Például az UV sugárzás következményei, az illékonyság, vízoldhatóság, a hidrolízisre vagy az oxidációra való hajlam megszabja azt, hogy a környezeti elem melyik fázisába kerül a vegyi anyag, milyen a kémiai formája és mekkora az élettartama.

Gyakori, hogy a xenobiotikum térbeli szerkezete, mérete és alakja egyezik valamely természetes anyagéval, emiatt bekerülhet a szennyezett területen élő ökoszisztémátagok normál anyagcseréje által az elemkörforgásba. Ennek eredménye maga a toxikus hatás is, amikor a szennyezőanyag receptorokhoz, aktív helyekhez kötődve károsítja, tönkreteszi az organizmus anyagcseréjét. Szerencsés esetben olyan biológiai átalakulásokon megy keresztül, melyek során hatástalan anyaggá transzformálódik, biodegradálódik vagy teljesen mineralizálódik, elveszítve toxikus hatását.

A biológiai átalakulás szerves szennyezőanyagok esetén az adott környezet tulajdonságaitól függően sokféle úton mehet végbe. A biodegradáció energiatermelés közben CO₂ és víz keletkezését jelenti, a bioakkumuláció főleg a lipofil szerves anyagoknál jelentős. A lipofilitást és a bioakkumulációra való hajlamot a szerves anyagok oktanol-víz megoszlási hányadosával (K_{ow}) jellemezhetjük. A biotranszformáció biológiai átalakítást jelent. A szerves szennyezőanyag biológiai átalakítása eredményezhet mind csökkent, mind megnövekedett toxicitású terméket.

A vegyi anyag kölcsönhatása az élőlényel molekuláris szinten

A hatás helye (receptor) és a hatás módja, vagyis a vegyi anyag és az organizmus közötti molekuláris szintű kölcsönhatás meghatározó fontosságú. A receptor lehet nukleinsav, egy membrán vagy idegvégződés specifikus fehérjéje és lehet egyáltalán nem specifikus molekula, mint a narkotikumok, melyek általában hatnak a membránokra, megváltoztatva áteresztőképességüket vagy egyéb tulajdonságukat, ezáltal pedig normális funkciójukat.

A molekuláris szintű kölcsönhatás következménye magasabb szinteken

A magasabb szinteken, tehát az organizmus, a populáció, a közösség vagy a teljes ökoszisztéma szintjén megjelenő válaszok bármelyikét értelmezhetjük ökotoxikológiai teszt mérendő paramétereként.

Molekuláris szinten; biokémiai paraméterek:

Stresszfehérjék termelése,
anyagcsereindikátorok megjelenése,
metallotionein termelés,
acetilkolin-észteráz gátlás,
immunszuppresszió.

Szerkezet szintjén; fiziológia és viselkedés:

Kromoszómasérülések,

lézió, nekrózis (szervkárosodás, elhalás),
daganatképződés,
teratogén hatások,
szaporodóképesség,
viselkedés megváltozása: kompenzáló viselkedés, pusztulás.

Populáció szintjén:

A populáció sűrűsége,
produktivitása,
párzás sikeressége,
genetikai struktúra megváltozása,
kompetíció megváltozása.

Közösség szintjén:

A közösség összetétele,
a közösség diverzitása,
a közösség stabilitása,
energiafelhasználásának hatékonysága,
a szukcesszió állapota.

Ökoszisztéma szinten:

A fajok összetétele és eloszlása,
anyagcsere, elemkörforgalom,
a táj megváltozása.

Ha a toxikológus és az ökotoxikológus jól le tudná írni az elsődleges hatások felsőbb szintekre vonatkozó következményeit, akkor egyszerű vizsgálatok eredményei, vagy akár pusztán a vegyi anyag szerkezetének ismerete alapján jól tudnánk előre jelezni az ökoszisztéma egészére várható hatást. Ma még távol vagyunk ettől a tudástól, így általában a felsőbb szinteken jelentkező válaszparaméterek mérését kell választanunk, nem pedig az alsó szintek eredménye alapján történő extrapolációt.

1.1.2. Az ökoszisztémák komplexitása, a vegyi anyagok ökológiai kockázata

Az ökoszisztémák és működésük megértéséhez komplex szemlélet szükséges. Az ökoszisztémát felépítő egyedekre más szabályok érvényesek, mint az ökoszisztémára. Ezért az egész ökoszisztémára vonatkozó környezeti kockázat megítélésekor komplex, dinamikus, a folyamatokat és változásokat térben és időben elhelyezni képes gondolkodásra van szükség. (Çambell, 1993).

A probléma tulajdonképpen az, hogy a veszélyes anyag az egyeddel lép kölcsönhatásba molekuláris szinten, de ez a hatás áttevődik egy komplex struktúrába, a teljes ökoszisztémába. Ez a két rendszer alapvetően eltérő tulajdonságú.

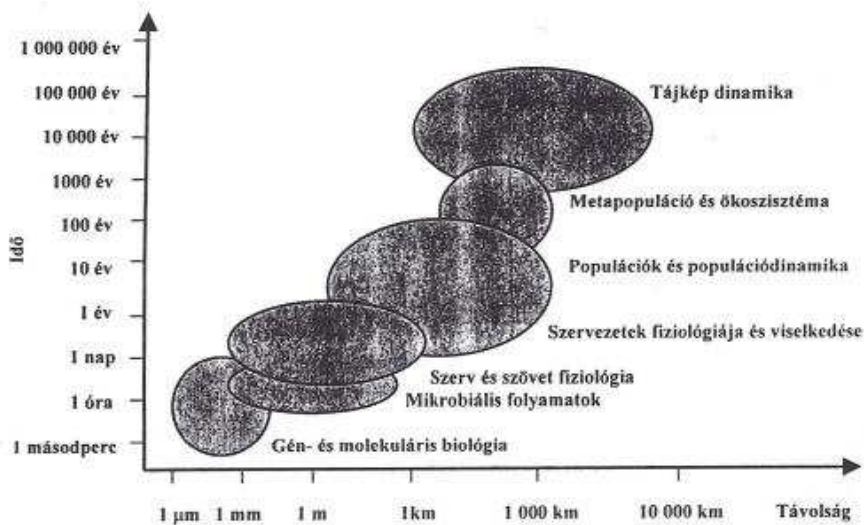
Az egyed konkrét genommal rendelkezik, minden sejtjében jelen van az azonos információ, a szervezeten belül jól szervezett kommunikációs rendszer működik. A

szomatikus sejtekben bekövetkező változások nem befolyásolják az utódok genomját. Az egyed homeosztázisa, immunrendszere stabil.

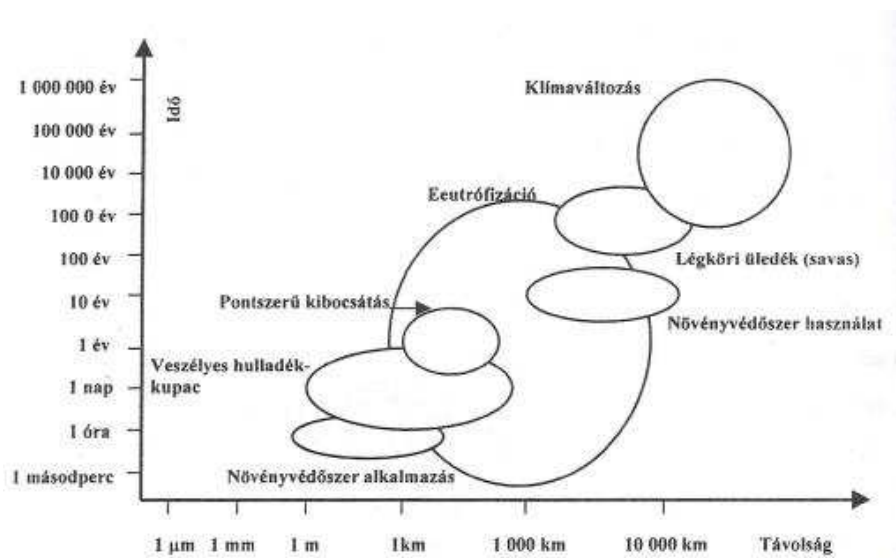
Az ökológiai rendszerek esetében nincs konzervált genom, az ökoszisztémára jellemző gének összessége állandóan változó. A végbemenő folyamatok irreverzibilisek. Nem alkalmazható tisztán sem a determinisztikus, sem a sztochasztikus modell, de a rendszer mindkettő elemeit tartalmazza. Nem lineáris összefüggések és kölcsönhatások jellemzik a komplex ökológiai rendszereket, az okozat nem arányos az okkal. Gyakori a szinergizmus, de antagonizmus is előfordul. A komplex rendszerek dinamikusak, nem áll be az egyensúly, folyamatosan változik az elérendő cél.

Ezek a tulajdonságok rendkívül fontosak a kockázat felmérése szempontjából, a tervezés, az adatkezelés és az eredmények interpretációja során. Feltételezhetjük, hogy az ökoszisztéma váratlan reakciókat fog produkálni egyes szennyezőanyagok hatására.

A molekuláris szinttől a teljes ökoszisztéma szintjéig megjelenő változásokhoz tartozik egy idő és hely szerinti skála is. Ezt mutatja a 3. ábra Landis és Yu (1999) nyomán. Érdekes összehasonlítást tesz lehetővé a 4. ábrán bemutatott környezet-szennyezés-típusok tér-idő diagramja.



3. ábra: Ökológiai folyamatok tér-idő diagramja (Landis és Yu, 1999)



4. ábra: Környezetszennyezés-típusok tér-idő diagramja (Landis és Yu, 1999)

1.2. Toxicitási tesztek, toxikus anyagok hatása

A **toxicitás** tágabb értelemben egy anyag káros hatása egy biológiai szervezetre. A toxicitást szűkebben értelmezve, megkülönböztethetjük a mutagén, karcinogén és teratogén hatásoktól.

A toxikus anyag lehet szerves vagy szervetlen vegyület vagy elem, amely a káros biológiai hatást kiváltja. A toxikus anyagokat gyakran megkülönböztetjük aszerint, hogy azok természetes anyagok vagy xenobiotikumok. Az antropogén eredetű, vagyis az ember közreműködésével előállított anyagok lehetnek azonosak, vagy nagyon hasonlóak a természetes eredetű toxikus anyagokhoz, mégis másképpen kell ezeket megítélnünk a nagy mennyiségben történő előállítás és használat miatt.

A **vegyi anyagok** immanens tulajdonságaként jelentkező veszélyességet, az ún. általános kockázatot minden esetben előrejelzésként fogalmazzuk meg, nem konkrét, hanem fiktív vagy átlagos környezetre vonatkoztatva. A célnak megfelelően választott ökotoxikológiai vagy toxikológiai tesztek eredménye alapján extrapolálunk az ökoszisztémára és az emberre várható hatásra. Az ökoszisztémára gyakorolt hatást egy küszöbértékkel jellemezzük, vagyis az előrejelzés szerint károsan még nem ható koncentrációval a PNEC értékkel (Predicted No Effect Concentration = előrejelzés szerint károsan még nem ható koncentráció)

Szennyezett területek állapotfelmérése, monitoringja, és kockázatának (előrejelezhető kár) meghatározása esetén konkrét szennyezett területhez kötődő hatást, ebből extrapolálható PNEC értéket, majd helyspecifikus kockázatot határozzunk meg.

Az itt várható káros hatásokat akkor tudjuk jól előre jelezni, ha retrospektív felmérést is végzünk, vagyis ha a kockázat időbeli változásának trendjét igyekszünk megállapítani, a múlt adatait is felhasználva. Ezt szerencsés esetben monitoring adatokra alapozhatjuk (idősor), kevésbé szerencsés esetben állapotfelmérésre (egy időpont). Ilyenkor az időben mindkét irányba való extrapolációval kaphatjuk meg a kockázat időbeli változását.

A környezetet szennyező vegyi anyag eredetét vizsgálva érdemes megkülönböztetni a **pontforrásokat és a diffúz** szennyeződésekkel illetve szennyezőforrásokat. A pontforrásokat könnyebb jellemezni, hiszen általában ismert a helyük, a szennyezőanyag hely szerinti eloszlása és a kibocsátott mennyiség, gondoljunk szennyvízkibocsátásra, hulladéklerakatokra, balesetekre. A diffúz szennyeződésekkel nehezebb jellemezni. A diffúz szennyeződések szinte mindig komplex keverékek, nagyobb területet érintenek, az eloszlás nem ismert és nehezen ismerhető meg. Diffúz szennyeződést okoz a mezőgazdaság (permetezés), a szennyezett üledék és talaj, vagy a levegőből kiülepedett szennyeződés.

A kockázatos vegyi anyagok közül említést érdemelnek a diffúzan jelentkező gázhalmazállapotú légszennyezőanyagok, melyek a globális környezeti problémák okozójaként kerültek a veszélyes anyagok prioritási listáira: S-oxidok, N-oxidok, ózon, CO és a fluoridok.

Egy másik anyagcsoport a toxikus fémek heterogén csoportja. Ezeket gyakran nehézfémek gyűjtőnéven is emlegetik, annak ellenére, hogy nem mind nehézfém (sűrűségük szerint), amelyik toxikus. A leggyakrabban előforduló és veszélyességük miatt vizsgált fémek az As, Cd, Cu, Co, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn. Az illékony higanyon kívül a többi toxikus fém főleg az üledékekben és a talajokban, kötött formában fordulnak elő, ahonnan fizikai-kémiai tulajdonságaik és a környezeti paraméterek által közösen meghatározott mozgékonyosságuk függvényében kerülnek át a vizes fázisba, a felszíni vízbe, a pórúsvízbe vagy a talajvízbe és más felszín alatti vizekbe.

A környezetünket szennyező vegyi anyagok harmadik nagy csoportját képezik a szerves szennyezőanyagok. Leggyakoribb vegyületcsoportok a peszticidek, a kőolajszármazékok, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH), ipari vegyi anyagok, mint oldószerek, detergensek, halogénezett alifás vegyületek, halogénezett benzolok, fenolok és fenolszármazékok, poliklórozott bifenilek (PCB), stb.

A szerves szennyezőanyag élőlények általi felvétele, a szervezetbe való bekerülés után három utat járhat: raktározódhat, metabolizálódhat vagy kiürülhet. Hogy melyik folyamat dominál, azt a szerves vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai valamint az érintett élőlény fiziológiai állapota és anyagcseréje együttesen szabja meg.

Felhalmozódik és raktározódik, ha a felvétel üteme nagyobb, mint a bontásé és/vagy a kiürülése. A raktározás gyakran a hatás helyétől izolálva történik, ez azt jelenti, hogy nincs közvetlenül káros hatása az illető egyedre. A táplálékláncra, a raktározó faj felett álló táplálkozási szintekre viszont annál inkább (bioakkumuláció, biokoncentráció). A veszélyes vegyületek sejten belüli raktározása magára a raktározó egyedre nézve is kockázatos, hiszen előfordulhat, hogy az egyed hirtelen meg-

változó anyagcsereje miatt (terhesség, fogyókúra) az addig izoláltan (csontban, zsírszövetben) raktározott anyag ismét felhasználásra kényszerül, ezáltal bekerül az anyagcsere-folyamatokba.

Átalakuláson, biotranszformáción eshetnek át, főként, ha a szervezetbe rendszeresen bekerülő xenobiotikumokról van szó. Ezek bejutnak az anyagcsere-folyamatokba, fizikai-kémiai változásokon, enzimes átalakításon, bontáson esnek át. Egy sor szerv és szövet végez méregtelenítést, így a bél, a tüdő, a vese, a bőr és a máj. A biotranszformáció általában két lépésben játszódik le. Az elsőben egy elsődleges termék jön létre oxidáció, redukció vagy hidrolízis útján. A másodikban általában vízoldható vegyületekhez kapcsolódnak, pl. glicin, cisztein, glutation, szulfátok, majd konjugátum formájában mennek tovább az endogén anyagcsere utakon vagy kerülnek kiválasztásra.

Külön említést érdemel a szerves szennyezőanyagok **mikrobiológiai degradációja**. A mikroorganizmusok elterjedtsége a földi ökoszisztémában és a holt szerves anyagok bontására kialakult határtalan genetikai potenciáljuk alkalmassá teszi őket a xenobiotikumok bontására is. Kis generációs idejük és gyors alkalmazkodóképességük révén szinte minden xenobiotikumot képesek lebontani, vagy energiatermeléssel összekötött folyamatokban, vagy kometabolizmus útján. A xenobiotikumok mikrobiológiai degradálhatósága nemcsak a mikroflóra genetikai képességétől és fiziológiai állapotától függ, de a xenobiotikum biológiai hozzáférhetőségétől, mozgékonyaságától, vízoldhatóságától, polaritásától, más szennyezőanyagokkal és a szennyezett környezeti elem fázisaival való kölcsönhatásától, stb.

A különböző környezeti elemek mikroflórájának nagyfokú alkalmazkodóképességét a mikrobaközösségek flexibilis genomja, kis generációs ideje, külső körülmények hatására fokozott ütemű evolúciója, változékonysága, adaptív enzimek és az egyre elterjedtebb mozgékony genetikai elemek (plazmidok, ugráló gének, stb.) is segítik, melyek képesek a xenobiotikum bontásához szükséges géneket megfelelő időben, megfelelő minőségben és mennyiségben előállítani, és azt a közösségben elterjeszteni.

1.2.1. Dózis-válasz és koncentráció-válasz összefüggés

Dózis az az aktuális anyagmennyiség, amely az organizmusba bekerül, melyet az organizmus különböző expozíciós útvonalakon felvesz.

A **dózis-válasz** összefüggést vizsgálva azt tapasztalhatjuk, hogy a vegyi anyagok kis dózisa gyakran stimulál. Más esetekben küszöbérték jelentkezik, ami azt jelenti, hogy növekvő koncentráció alkalmazása ellenére egy küszöbértékig nem jelentkezik a hatás. Ez általában a káros hatást kompenzáló metabolikus aktivitás létezésével, illetve kapacitásának kimerülésével magyarázható.

Az ökotoxikológus dózis helyett környezeti koncentrációval dolgozik, koncentrációértékeket használ, hiszen az ökoszisztémában, az ökoszisztéma tagjai esetében nem tudjuk ellenőrizni, hogy a környezetben lévő anyagból mennyi jut be a szervezetbe. A humántoxikológusok által ismert dózisoknak kitétt (beinjektált, megettetett)

állatokkal szemben, a környezettel szoros kapcsolatban lévő organizmus a vegyi anyagnak több expozíciós útvonalon keresztül is kitett. Például egy talajlakó ugró-villás teljes testfelületével érintkezik a talajjal, belégyi a talajgözoeket, és ha éhezik, emésztés útján is jut talaj a szervezetébe. A földigiliszta teljes külső és belső (bélrendszer) felületével érintkezik a talajjal. A növényi gyökerek és a mikroorganizmusok lokálisan kibocsátott anyagaikkal kölcsönhatásba lépnek a szennyezett talajjal, mobilizálják a környezetükben lévő anyagokat.

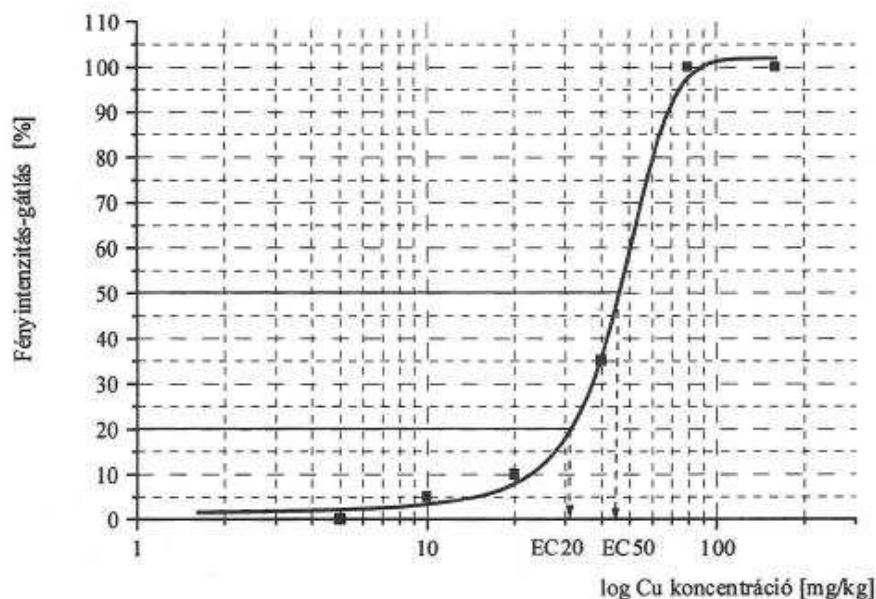
A környezeti koncentráció és a felvett dózis tehát nincs egymással szoros összefüggésben. Az organizmus fajlagos felülete, alakja, határolófelületének minősége, légzése, stb. nagyban befolyásolja a környezeti koncentráció – felvett dózis arányt. A környezetből felvett mennyiség fajfüggő.

Az ökotoxikológiai mérés **végpontja** a biokémiai szinttől az organizmus és közösség szintjén keresztül az ökoszisztéma szintjéig bárhol megválasztható a cél függvényében. A mérhető végpont eredménye alapján gyakran további származtatott értékeket használunk fel a kockázat mértékének megállapításához, döntések előkészítéséhez. Emiatt meg kell különböztetnünk a mérés végpontját, amely nem más, mint a tesztorganizmuson vagy más szinten közvetlenül mért érték, és a teszt számítással származtatott vizsgálati végpontját. Gyakori mérési végpont a stressz-fehérjék megjelenése, enzimek aktivitása, fénykibocsátás, mozgásképtelenség, halál, fajok kölcsönhatása, fajeloszlás, stb. A mérési végpontokból származtatott eredmény többletinformációt tartalmaz: pl. fénykibocsátásból relatív luminenszcenciagátlás, enzimaktivitásból integrált érték a mérési időszakra vonatkozó görbe alatti terület, a koncentráció – hatás görbe egyezményes pontjai, pl. az 50 %-os gátláshoz tartozó koncentráció, vagy a hatást még nem mutató legnagyobb koncentráció, stb.

1.2.1.1. A koncentráció – válasz összefüggés

A koncentráció – válasz összefüggést kísérletesen vizsgáljuk, úgy, hogy a kérdéses vegyi anyag (vagy környezeti minta) növekvő koncentrációinak függvényében mérjük **a hatást**, a megfelelően megválasztott ökotoxikológiai végpontot, laboratóriumi vagy ritkábban szabadföldi körülmények között.

A koncentráció – hatás görbe szigmoid alakú, tulajdonképpen a növekvő koncentrációból adódó kumulált toxicitást mutatja a vegyi anyag koncentrációjának függvényében. Azonos a dózis-hatás görbék alakja is, de ott a vízszintes tengelyen a vegyi anyag, vagy a környezeti minta mennyisége szerepel tömegegységben megadva. Ismeretlen vegyi anyagokat tartalmazó környezeti minták esetében nem tudunk hatásos koncentrációt megadni, csak a vizsgált környezeti minta hatásos mennyiségét. De ezekben a környezeti minta mennyiségekben ismeretlen koncentrációban vannak jelen az ismeretlen anyagok. Ennek a problémának az áthidalására ad lehetőséget Gruiz és mtsai (1998c) által kidolgozott eljárás, a toxicitás rézekvivalens koncentrációban való kifejezése (ld lumineszcencia gátlás mérése). A réz-koncentrációk függvényében felvett szigmoid görbe linearizálható szakasza kalibrációs egyenesként szolgál ismeretlen toxicitású környezeti minták pl. LC_{50} értékének rézekvivalens koncentrációban történő megadásához.



5. ábra: Koncentráció – hatás összefüggés: *Photobacterium phosphoreum* lumineszcenciagátlása (H%) növekvő oldott réz mennyiség függvényében

1.2.1.2. Akut toxicitás

Akut toxicitás mérése esetén (rövid idejű kitettség) a koncentráció – hatás görbéről leolvashatjuk a 10, 20, 50 vagy 90 %-os gátlást okozó koncentrációt, vagy a görbe meredekségét. Ennek megfelelően az alábbi vizsgálati végpontokat szokták, mint eredményt szokták megadni.

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.

A koncentráció – hatás görbe meredekségét használva vegyi anyagok toxicitásának jellemzésére eltérő eredményt kaphatunk, mint az EC_x értékeket használva, hiszen a szigmoid görbék alakja eltérő lehet.

Akut toxicitás mérése esetén a tesztelési idő rövidege miatt könnyen elkövetjük azt a hibát, hogy a hatás csak a teszt idejének lejárta után jelentkezik. Ezt kiküszöbölendő hosszú távú, un. krónikus vizsgálatokat kell végezni. A hosszú távú vizsgálatokban az utódok létrehozására gyakorolt hatást is mérhetjük. Az utódok számát is mérő tesztek a reprodukivitási tesztek.

1.2.1.3. Krónikus toxicitás

Krónikus toxicitás (hosszú idejű teszt) vizsgálatából az alábbi, 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.

A NOEC és a LOEC egymásból számíthatóak: pl. $NOEC = LOEC/2$

MATC a LOEC és NOEC érték átlagaként számítható.

Giesy és munkatársa (1989) a hosszú távú hatások becslésének lehetőségeit vizsgálták az akut toxicitási tesztek eredményeinek felhasználásával. A krónikus (hosszú távú) hatások jellemzésére a NOAEL-t, míg az akut hatások jelzőszámául az LC_{50} -et használták, és egy akut-krónikus arányt (Acute Chronic Rate = ACR) definiáltak, amely a következő:

$$ACR = \frac{LC_{50}^{96 \text{ hr}}}{NOAEL}$$

ahol, az LC_{50} a 96 órás behatás után bekövetkező LC_{50} -et jelöli. Az ACR arány jelentősége abban rejlik, hogy egy adott faj esetén különböző, de azonos vegyületcsoportba tartozó szennyezőanyagok ACR értéke azonosnak tekinthető, így az akut érték (LC_{50}) ismeretében a krónikus érték (NOAEL) egy másik vegyület ACR érté-

kéből kiszámítható (Kenaga, 1982). Az ACR értékeket néhány vegyületre és elemre Giesy és munkatársa (1989) összefoglalta és publikálta.

A krónikus tesztek eredménye tehát egy olyan érték, amely statisztikailag nem mutat szignifikáns hatást. Az alábbiakban felsoroljuk azokat a tényezőket, amelyek befolyásolják a krónikus teszteredmény megbízhatóságát, jóságát.

- A minta mérete és az ismétlések száma.
- A megfigyelt végpontok száma.
- A vizsgált koncentrációsor (dózissorozat) tagjainak száma, azaz a vízszintes tengely felbontása.
- A végpont mérhetősége.
- A vizsgált szervezet vagy populáció változékonysága a végpont szempontjából.
- Az értékeléshez alkalmazott statisztikai módszer.

Rendkívül fontos az ökotoxikológiai módszerek szabványosítása, hogy a különböző laboratóriumokban mért eredményeket össze lehessen egymással hasonlítani.

A standardizált módszerekkel kapott ökotoxikológiai eredmények hasznosságát, előnyeit foglaljuk össze a következőkben.

- Egységes és összehasonlítható módszerek jönnek létre a szabványosítással.
- Standard, törzsgyűjteményben, kereskedelmi forgalomban kapható teszt-organizmusok, tesztrendszerek, előregyártott készletek beszerezhetőek.
- A mérés és az eredmény megismételhető bármelyik laboratóriumban.
- Kockázatfelmérésre és döntési folyamatok támogatására alkalmas eredményeket ad.
- Egyszerűsített eljárások, különösebb fejlesztés nélkül alkalmazhatóak.
- Ha nagyszámú eredményre van szükség statisztikai értékeléshez, pl. határértékképzéshez, QSAR-hoz vagy kockázatfelméréshez, akkor különböző laboratóriumok eredményei együtt felhasználhatóak.
- Célszerű módosításokkal tudományos kutatási célokra is megfelelnek.
- Az elmúlt években egy sor standard módszer született az USA-ban és az európai államokban. Egységes európai szabványok is léteznek, különböző országok ökotoxikológiai laboratóriumaiban végzett ellenőrző körmérésekkel alátámasztva.

A szabványok általában az alábbi információkat tartalmazzák:

- Referencia dokumentum, terminológia, a módszer leírása, használhatóság.
- A módszerrel járó kockázatok és biztonsági előírások.
- Standard műszerek, hígítóanyagok jellemzése, beszerezhetősége, víztoxikológiai teszteknel hígítóvíz, talajtoxicitási teszteknel standard talaj jellemzése és hozzáférhetőségének megadása.
- Az elfogadott és ajánlott tesztorganizmusok listája, a tesztorganizmussal szemben támasztott részletes kritériumok, a tesztorganizmus egészségi áll-

lapotára vonatkozó követelmények, a tesztorganizmus optimális nagysága és kora. Gyakran a tesztorganizmus beszerezhetőségét is megadják.

- A kísérleti módszer részletes leírása tartalmazza a tervezést, a fizikai és kémiai feltételeket, a tesztkamra vagy edény méretét, az alkalmazandó koncentrációkat, hígításokat.
- A mérés során alkalmazandó analitikai módszerek leírását.
- Az eredmények elfogadhatóságának kritériumait.
- A megfelelő eredmény képzését, számítását (EC_{50} , NOEL, stb.)
- A szükséges statisztikai értékelő módszereket.

A standard módszerek alkalmazásának hátrányai is vannak. Általában konkrét környezetvédelmi vagy egészségvédelmi céllal fejlesztették ki őket, ezért sosem szabad egy módszert sem vakon alkalmaznunk. Először meg kell ismernünk a konkrét környezeti problémát, az ökotoxikológiai vizsgálat célját, és azután ahhoz megtalálni a megfelelően megismert és elemzett standard ökotoxikológiai módszert, vagy annak módosított változatát.

Magyarországon is léteznek környezetvédelmi célokat szolgáló szabványosított biológiai és ökotoxikológiai tesztek. Ezen tesztek egy részét vegyi anyagok, elsősorban peszticidek engedélyezéséhez szükséges eljárás során alkalmazzák, másik részét szennyvizek és veszélyes hulladékok minősítésére és a befogadók monitorozására dolgozták ki. Ezek listája a mellékletben található.

1.2.2. Toxicitási tesztek osztályozása

Két fő szempont szerint osztályozzuk az ökotoxikológiai tesztek. Az egyik a tesztelés időtartama, a másik a tesztorganizmus faja, illetve a tesztrendszer fajösszetétele.

A tesztelés **időtartama** szerint akut (rövid időtartam) és krónikus (hosszabb időtartam) teszteket különböztetünk meg, amint azt már láttuk az előző fejezetben.

Az **akut tesztek** a leggyakrabban alkalmazott tesztorganizmusok (*Daphnia*, hal, patkány, madarak) esetében általában 24-48 óra időtartamúak. Az egy fajt alkalmazó akut tesztek időtartama alatt nincs reprodukció. Mikroorganizmusokkal végzett akut toxicitási tesztek mindössze néhány percet vesznek igénybe (pl. *Photobacterium phosphoreum* lumineszcencia gátlási teszt).

Az egy fajt alkalmazó **krónikus tesztek** időigénye a tesztorganizmus életidejétől és reprodukciós ciklusának hosszától függ. A krónikus teszt a kísérleti állat élettartamának nagyobb részét magába foglalja. Általában nem multigenerációsak, csupán egy-két generációt fognak át.

A **reproduktivitási tesztek** fajonként igen nagy eltérést mutatnak. A női ivarú állatok peteérésének és a hímivarúak spermatogenezisének periódusával összhangban kell meghatározni a tesztelési időszakot.

A **növekedési tesztek** a mikroorganizmusok, beleértve az algákat és az állati egysejtűeket is, biomassa produkcióján vagy sejtszámán, illetve azzal arányos más végpont mérésén alapulnak.

A **több fajt alkalmazó tesztek** két, vagy több faj kölcsönhatásait is vizsgálják. A populációdinamika eredményeképpen létrejövő változások, mint pl. a préda–predator kölcsönhatás vagy a kompetíció vizsgálata a célja ezeknek a teszteknek. A több fajt alkalmazó tesztek **mikrokozmosz teszteknek** is nevezzük. A mikrokozmoszban vizsgálhatóak a fajok közötti és a közösségen belüli kölcsönhatások, valamint a biota kölcsönhatása az abiotikus faktorokkal. A mikrokozmoszok nincsenek szabványosítva térfogat, méret, vagy bonyolultság szerint. Egyesek az 100 ml-es térfogatú rázott lombikban modellezett szennyvíztisztítást, vagy az 500 g tömegű tenyészedény kísérleteket már mikrokozmosznak tekintik, mások több száz liter térfogatú mikrokozmoszról beszélnek, amit megint mások már mezokozmosznak neveznek.

A **mezokozmosz** már sokkal hűségesebb modellje a valóságos ökoszisztémának. A mezokozmoszokban több trofikus szint is képviselve van, komplexebb, mint a mikrokozmosz. Általában a szabadban alakítják ki, hogy a rendszer ki legyen téve az olyan természetes behatásoknak, mint a csapadék, a sugárzások, a napfény és az atmoszférából leülepedő anyagok. Amíg a mikrokozmosz laboratóriumban összeállított kísérletet jelent, addig a mezokozmosz gyakran természetes ökoszisztémák izolált és kontrollált része. A mezokozmoszban a komplex ökoszisztémákra jellemző strukturális és funkcionális jellemzők vizsgálatára is mód van.

A **szabadföldi vizsgálatok** olyan szintet jelentenek, amikor nem egy modellt használunk, amiből extrapolálunk a komplex ökoszisztémára, hanem direkt módon vizsgáljuk a szabadföldi viszonyokat. Természetesen ennek legnagyobb a környezeti realizmusa, de igen költséges és egy sor nehézséggel állítja szembe a kutatót. A szabadföldi vizsgálat lehet megfigyelés vagy kísérlet. Magába foglalja a biológiai szervezetek minden szintjének vizsgálatát. Az eredményt nagyban befolyásolják a természetes ökoszisztémákra jellemző hely és idő szerinti, valamint az evolúciós heterogenitások. A szabadföldi vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása a laboratóriumi teszteredményekkel, illetve azok alapján az ökoszisztéma egészére extrapolált értékekkel, igen aktuális kutatási terület a környezettoxicológia tudománya számára. Az eredmények információkat adhatnak, és megoldásokat szolgáltathatnak a „lab-to-field” dilemmára, vagyis arra, hogy a laboratóriumban kapott biológiai válaszok, ökotoxikológiai teszteredmények mennyire és hogyan vihetők át a valódi ökoszisztémákra.

1.2.3. Ökotoxikológiai tesztek tervezése

A toxicitási tesztek, mint bármely kísérletet a cél függvényében meg kell tervezni. Tervezés szempontjából is megkülönböztetjük az egy fajt alkalmazó szakaszos vagy folyamatos (pl. átfolyó) tesztek tervezését a több fajt alkalmazó toxicitási tesztektől.

1.2.3.1. Egy fajt alkalmazó tesztek

Egy fajt alkalmazó tesztek esetében további különbséget jelent az, hogy vízi vagy szárazföldi ökoszisztéma tagjáról van-e szó, vagy esetleg üledéklakóról. A környezeti elem szerinti megkülönböztetés azért fontos, mert ettől függően az expozíciós útvonalak is eltérnek.

Vízi tesztek esetében az expozíciót akkor szimuláljuk jól, ha az egész testet éri, módja van összeadódni a bőrkontakt, a légzés és az emésztés eredményeképpen az organizmusba jutott anyagmennyiség hatásának.

Az ökotoxikológus szárazföldi ökoszisztémák esetében is tud olyan körülményeket és talajlakó tesztorganizmusokat választani, melyek teljes testfelületükkel érintkeznek a talajjal (pl. földigiliszta, *Collembola*, növényi gyökerek, stb.). A toxikológusok általában az állat tömege alapján meghatározott pontos dózisokat juttatnak a szárazföldi állatokba etetéssel vagy injektálással. Szennyezett környezeti elemeknek kitett állatok esetében mindig összetett az expozíció, néha kiszámíthatatlan módon jelenik meg, pl. az állat a szőrére tapadt szennyezett talajt lenyalja, amikor mosakszik, stb.

Az üledéklakók esetében az üledékkel való közvetlen érintkezés miatt még bonyolultabb és speciális expozíciós útvonalak lehetségesek, amelyeket fel lehet használni a toxicitás teszteléséhez.

A tesztorganizmus helyes megválasztása az ökotoxikológiai teszt kritikus pontja. A tesztorganizmusnak meg kell felelnie a vizsgálati célnak és igen fontos az egészségi állapota. Több fajt alkalmazó tesztnél meghatározó a felhasznált közösség összetétele.

Az ökotoxikológiai tesztelés célját a legfontosabb tisztázni. Ha egy bizonyos faj védelme a célunk, akkor magát a védendő fajt és a számára táplálékul szolgáló fajokat kell vizsgálni. Ha egy vegyi anyag vagy egy szennyezett környezeti minta általános toxicitására vagyunk kíváncsiak, akkor több, különböző trofikus szintet reprezentáló fajt kell alkalmaznunk.

A tesztorganizmus kiválasztásához adunk meg néhány szempontot illetve követelményt az alábbiakban:

- Könnyen hozzáférhető faj legyen törzsgyűjteményből vagy természetből.
- Fenntartható és tenyészthető legyen laboratóriumi körülmények között.
- A tenyésztés története, genetikája ismert legyen: két igen jól ismert laboratóriumi tesztorganizmus az *Escherichia coli* és a norvég patkány.
- Érzékeny legyen több különböző típusú vegyi anyagra.
- Jól mérhető végpontja legyen, reprodukálható eredményt adjon.
- Ne legyen patogén, ne hordozzon más kockázatot.
- Jól reprezentálja osztályát vagy trofikus szintjét.

Utóbbi kritérium azért túlzó, mert sem az ökoszisztémát, sem annak trofikus szintjeit általában nem ismerjük olyan jól, hogy el tudnánk dönteni, hogy melyik tesztorganizmus reprezentálja azt jól.

Vita van abban is, hogy a legérzékenyebb ökoszisztéma tagot kell-e alkalmaznunk vagy sem. Ez a vizsgálat célja ismeretében egyes esetekben eldönthető (korai figyelmeztető rendszerek), más esetekben nem (vegyi anyagok engedélyezése). Egy másik dilemma, hogy valóban a legérzékenyebbet kell-e védenünk? Sokan az ökoszisztéma védelmét, az ökoszisztéma szempontjából még elfogadható káros hatást úgy definiálják, illetve ahhoz a feltételhez kötik, hogy az eredeti fajeloszlás 95 %-os valószínűséggel változatlan maradjon. Ez a megfogalmazás nyilvánvalóan nem a legérzékenyebb ökoszisztéma komponensét veszi alapul. Az is problémát jelent, hogy általában nem tudjuk, hogy melyik a legérzékenyebb ökoszisztéma tag. Gondoljunk egy talajra, ahol a talaj ökoszisztémájában igen fontos mikroorganizmusok legtöbbjét (fonális baktériumok) még izolálni vagy kimutatni sem tudjuk.

A teszteredmények statisztikai értékelése

A toxicitási tesztek minden esetben **statisztikai módszerekkel** kell értékelni. (Jorgenssen és mtsai, 1998). Az ökotoxikológiai tesztek nagy idő és munkaigénye miatt a statisztikai értékelés, helyesebben az értékeléshez szükséges mintaszám kompromisszum kérdése.

Az utóbbi években egy sor statisztikai eszköz szoftver formájában is hozzáférhetővé vált. Az adatok statisztikai értékelésével minimálisra szoríthatjuk le a vizsgálatok számát. Természetesen nem lehet tervezés és előzetes megfontolások nélkül alkalmazni ezeket a szoftvereket a mérési adatok értékelésére. Tehát a vizsgálatok tervezése során a mintaszámot és az ismétlések számát az értékelő statisztikai módszerrel harmonizálva kell megválasztani.

Az egyik legnépszerűbb módszer a **grafikus interpoláció** a toxikus végpontok (pl. EC_{50}) becslésére. Kényelmes módszer és jól használható a dózis-válasz illetve koncentráció-hatás görbék analizálására. Hátránya, hogy nem képes konfidencia intervallumot számítani.

A **probit módszer** terjedt el legszélesebb körben. Az adatokat valószínűségi egységgé (probability unit) transzformálja. Hátránya, hogy olyan adatsorra van szüksége, amely legalább két részleges letalitási eredményt tartalmaz (pl. 7 elpusztult a 20 tesztorganizmusból). Előnye, hogy könnyűszerrel számítja a konfidencia intervallumokat.

A **logit módszer** is transzformálja az adatokat, majd megkeresi az adatsorhoz legjobban illeszkedő görbét.

Néhány általánosan használt és hozzáférhető program: TOXSTAT, SAS-PROBIT, SPSS-PROBIT, DULUTH-TOX, ASTM-PROBIT.

A **krónikus toxicitási tesztek** statisztikai értékelésében legfontosabb annak a koncentrációnak a meghatározása, amelynek eredménye szignifikánsan eltér a keze-

letlen kontrollétól. Az ANOVA alkalmazásának célja általában a MATC meghatározása. Az ANOVA variancia-analízis folyamata a következő:

- Az adatok transzformálása.
- A kezeletlen kontroll és a vivőanyagot (pl. oldószert) tartalmazó kontroll összevetése, azonosságának ellenőrzése.
- A kezelt csoportok variancia-analízise.
- A kezelt csoportok összehasonlítása annak megállapítására, hogy melyik különbözik a kezeletlen kontrolltól.

Az ANOVA a MATC értéket a LOEC és a NOEC között állapítja meg:

$$\text{LOEC} > \text{MATC} > \text{NOEC}.$$

1.2.3.2. Több fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek tervezése

A több fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek a mikrokozmosz és a mezokozmosz tesztek. Ezeket az elmúlt 20 évben fejlesztették ki és 1 literes mérettől több ezer, esetleg millió literig is változhat a méretük. Gearing (1989) áttekintésében 11 módszert ismertet édesvízi mesterséges folyamat kialakítására. 22 laboratóriumi vízi mikrokozmoszt sorol fel 0,1 litertől 8 400 literig, és 18 szabadtéri édesvízi mikrokozmoszt 8 litertől 18 millió literig.

A mikro- és mezokozmoszok leggyakoribb megoldásai:

- a mesterséges édesvízi folyam,
- általános édesvíz,
- mesterséges mocsár,
- szimulált mezőgazdasági víztározó,
- mesterséges kert,
- mesterséges erdő, stb.

Ahhoz, hogy több fajt tartalmazó ökotoxikológiai tesztek tervezni meg kell értenünk a különbségeket az egyfajú tesztekhez képest. A mikro- és mezokozmoszok az ökológiai rendszerek jellegzetességeit hordozzák magukban, komplexek, több trofikus szintet tartalmaznak, modellezik a természetes ökoszisztémákat, a tápanyagellátást, a napfényt, a közeg fizikai-kémiai tulajdonságait, stb.

Az ökológiai rendszerek legfontosabb tulajdonsága, hogy a bennük folyó változásoknak időben meghatározott irányuk van, azaz az időben irreverzibilisek. Ezt a tervezéskor is figyelembe kell venni.

A mikrokozmosz másik fontos tulajdonsága, hogy evolúció folyik benne. Erre jó példa a kemosztát, amely egy mikrobiológiai alapú mezokozmosz, melynek célja új anyagcsereutak forszírozott kialakítása szelekciós nyomás alkalmazásával, például peszticidek vagy más hasonló, nehezen bontható szerves szennyezőanyagok biodegradációjának megoldására.

A mikrokozmoszok és mezokozmoszok paradoxonja, hogy a mesterséges ökoszisztéma modellel tulajdonképpen egy homogén rendszert akarunk létrehozni, hogy jobb statisztikája legyen a vizsgálat eredményének a szabadföldi vizsgálathoz képest, de ezzel veszítünk a környezeti realizmusból, dinamikusan szemlélve csökken a valószínűsége, pl. a heterogenitással együtt járó jobb alkalmazkodóképességből következő ellenálló képesség kialakulásának.

Az eredmények értékelése, az adatanalízis és interpretáció még nehezebb feladat, mint az egy fajt alkalmazó teszteké. Problémát okoz a megfelelő ismétlések (párhuzamos kísérletek) megalkotása. Azonos kísérletből vett minták, vagy idősor szerinti minták nem tekinthetők párhuzamosoknak, ezek legfeljebb a kísérlet heterogenitását mutatják.

Az adatok értékeléséhez olyan többváltozós módszereket kell alkalmazni, amelyek alkalmasak az ökológiai adatszoportok közötti törvényszerűségek felfedezésére. Két elterjedten alkalmazott módszer a PCA (Principal Components Analysis = főkomponens analízis) és az NCAA (Nonmetric Clustering and Assotiation Analysis = nem metrikus klaszteranalízis)

Mikrokozmosz és mezokozmosz tervezésének alapelvei

- Komplex struktúra, nem egyensúlyi, nem lineáris és történelme van.
- Szigorúan véve nem lehet megismételni, ezért fontos a törvényszerűségek ismerete.
- Minden behatásnak befolyása van a komplex rendszerre, ezért a LOEC és NOEC értékekre sincs garancia.

Mikrokozmosz és mezokozmosz tervezésének szempontjai:

- A fajok közti kölcsönhatásokat ismerni kell.
- Gradiensek léteznek a környezeti tulajdonságokban.
- Minden kezelést azonos ismétlésszámmal kell végezni.
- Azonos kísérletből vett több minta nem számít ismétlésnek.
- Az adatértékeléshez többváltozós statisztikai módszer szükséges, pl. klaszteranalízis (csoportosításon alapuló) vagy más olyan értékelési technikák előnyösek, amelyek az összefüggésekre derítenek fényt (Jorgenssen és mtsai, 1998).

1.3. Általánosan használt teszt módszerek

Ebben a fejezetben néhány elterjedten alkalmazott teszt módszert ismertetünk, főként olyanokat, amelyek a vízi ökoszisztémák jellemzését szolgálják, hiszen a talaj ökotoxikológiai tesztelésével a könyv külön fejezete foglalkozik. Ismertetünk egy fajt alkalmazó akut és krónikus teszteket, valamint több faj vizsgálatát megvalósító mikrokozmosz és mezokozmosz teszteket.

Ahhoz, hogy egy bizonyos célhoz megtaláljuk a legmegfelelőbb ökotoxikológiai vizsgálatot, alaposan meg kell ismernünk a teszt módszert, a tesztorganizmust, át kell

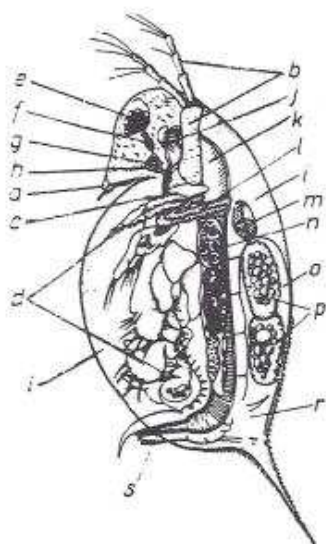
érezniük, hogy az adott teszt eredménye mit jelent. Gyakran standard módszereket alkalmazunk, hogy egy adott környezeti problémát részleteiben is megismerhessünk.

1.3.1. *Daphnia*, 48 órás akut teszt

A *Daphnia*, a vízibolha az egyik legelterjedtebb vízi tesztorganizmus. Két faja népszerű, mint ökotoxikológiai tesztorganizmus: a *Daphnia magna* és a *Daphnia pulex*.

Teszteléshez a laboratóriumban nevelt harmadik generáció alkalmazható. A *D. pulex*, a kis vízibolha, kisebb méretű és a lágyabb vizet is tolerálja.

A víz minősége az egyik legfontosabb faktor a teszt kivitelezése során. A víz nem tartalmazhat klórt, halogénezett szerves vegyületeket, nehézfémeket és szerves makro- és mikroszennyezőanyagokat. Ahol jó minőségű vezeték- vagy kútvíz van, ott csak kisebb fokú víztisztításra van szükség. Ahol rossz minőségű a víz, ott komolyabb, esetleg többlépcsős víztisztításra van szükség; szűrésre, desztillációra. A minták hígítására használt víznek azonos minőségűnek kell lennie a *Daphnia* fenntartására szolgáló vízzel.



- a: első csáp
- b: második csáp
- c: rágó
- d: torlábak
- e: összetett szem
- f: ganglion optikum
- g: agydúc
- h: naupliusz szem
- i: középbéli mirigy
- k: bélcsatorna
- l: állkapcsi mirigy
- m: szív
- n: petefészkek
- o: költőtér
- p: embriók
- r: hátnyúlvány
- s: végbélnyílás

6. ábra: *Daphnia pulex*, kis vízibolha

Referenciaanyagként Na-pentaklórfenolt szoktak alkalmazni. A referencia vegyület toxikus hatására adott válaszból következtethetünk a tesztorganizmus egészséges állapotára és a tesztkörülmények megfelelő voltára. Referenciaanyagként Na-pentaklórfenolt szoktak alkalmazni. A referencia vegyület toxikus hatására adott

válaszból következtethetünk a tesztorganizmus egészséges állapotára és a tesztkörülmények megfelelő voltára.

A teszteléshez 10 db 24 órásnál nem idősebb újszülöttet használunk. Az állatkákat 100 ml tesztoldatot tartalmazó 125 ml-es edénybe helyezzük. A tesztelendő vegyi anyag 5 különböző koncentrációját vizsgáljuk, ehhez adódik a negatív kontroll és a referenciaanyag. Általában 3 ismétlés szükséges a megfelelő minőségű eredményhez.

Az állatkák halálát nehéz megállapítani, ezért végpontként a mozgásképtelenséget illetve mozdulatlanságot használjuk. Akkor tekinthető mozdulatlannak egy vízi bolha, ha üvegpipettával vagy üvegrúddal megpiszkálva sem mozdul meg. A mérést 24 óra és 48 óra elteltével végezzük. Az akut teszt során nem etetjük az állatokat. Optimális hőmérséklet 20 °C, a megvilágító fény intenzitása 540 - 1000 lux közötti érték lehet, 16 órás megvilágítást 8 óra sötétség követ. A pH: 7,0-8,6 között változhat, az oldott oxigén koncentrációja 60-100 %.

A 48 órás akut teszt jól alkalmazható „tiszta” vegyi anyagok veszélyességének felmérésére, vegyi anyagok keverékeire, szennyvizekre és más elfolyó vizekre, veszélyes hulladékokra.

Az egyes *Daphnia* fajok és változatok érzékenysége nagymértékben eltérhet egymástól, ezért igen fontos a tesztorganizmus azonosítása és megadása. Ha különböző laboratóriumok eredményeit össze akarjuk hasonlítani, akkor azonos klónból származó állatokat kell alkalmazni.

A teszt előnye, hogy kivitelezése nem költséges, magának a tesztnek a környezeti- és egészségkockázata kicsi, időigénye szintén kicsi. Hátránya, hogy kényes a víz minőségére és egyes esetekben túlzott érzékenységet mutat.

1.3.2. *Daphnia*, krónikus teszt

A 21 napos krónikus teszt során az állatok túlélésén kívül növekedésüket és szaporodásukat is vizsgálhatjuk.

A viszonylag hosszú idejű teszt során az állatok etetéséről gondoskodni kell. Általában algákat és laboratóriumként eltérő adalékokat alkalmaznak.

A teszt kivitele lehet szakaszos vagy folytonos. A szakaszos kísérletet rendszeresen frissíteni kell. A folyamatos átfolyást biztosító kamra egyik előnye, hogy hígítással állandó összetételű és minőségű közeget produkál, nem kell frissíteni, így az átrakással nem sérülhetnek meg az állatok, mint a szakaszos frissítésnél.

Egy módosított változat a *Ceriodaphnia dubia* fajt alkalmazza a krónikus teszt-hez. A *C. dubia* kisebb méretű, mint a *D. magna*, gyorsabban szaporodik, így a teszt ideje lerövidül, kisebb edényben, kisebb költséggel oldható meg. A kis méret viszont ügyesebb kezét, esetleg mikroszkóp alatti munkát igényel.

Ez a faj is igényes a táplálékra, olyan összetételű táplálék szükséges, mely a viszonylag hosszú idő alatt is biztosítja a tesztállatok egészségét, fejlődését és szaporodását.

A krónikus teszt szintén 10 állatot alkalmaz, minimum 2 ismétlésben, 100 ml-es edényben 80 ml tesztoldattal, 21 napon keresztül. A hőmérséklet 20 °C, a megvilágító fény intenzitása 600 lux, 16 órás megvilágítást 15-30 perces átmenet biztosításával 8 órás sötétség követ. Az oldott oxigén koncentráció 40-100%, külön levegőztetés nem szükséges. A végpontok a túlélés, a növekedés és a szaporodás.

1.3.3. Alga növekedési teszt

A 96 órás alga növekedési teszt a toxikus vegyi anyagoknak az elsődleges termelők anyagcsere-folyamataira gyakorolt gátló hatását vizsgálja. Édesvízi és tengeri algákat használhatunk tesztorganizmusként, attól függően, hogy milyen vízi ökoszisztémára vonatkozó kockázatot akarunk vizsgálni.

Rendkívül sokféle algát használnak toxicitás mérésre. Az alábbiakat az ASTM (American Society for Testing and Materials) ajánlja.

Édesvízi algák

- Zöld algák: *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*
- Kék algák (cianobaktériumok): *Microcystus aeruginosa*, *Anabena flos-aquae*
- Kovamoszatok: *Navicula pelliculosa*

Tengeri algák

- Kovamoszatok: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*
- Ostoros moszatok: *Dunaliella tertoelecta*

A tesztet $2-5 \times 10^4$ db sejt / tesztoldat koncentrációjú algaszuszpenzióval végezzük. A sejtek koncentrációját naponta meghatározzuk. Használhatunk mikroszkópos számlálókamrát vagy elektromos részecskeszámlálót. Meghatározhatjuk a sejtszámmal, illetve a fotoredukció mértékével arányos klorofill mennyiségét is a tesztuszuszepezióban. A klorofillt a sejtek feltárása után vízzel nem elegyedő oldószerrel extraháljuk, majd spektrofotométerrel vagy fluoriméterrel határozzuk meg a mennyiségét. A sejtek DNS vagy ATP tartalmát is mérhetjük, a ^{14}C asszimiláció mérésével pedig tovább növelhetjük a módszer szelektivitását és érzékenységét.

A teszt kivitelezéséhez Erlenmeyer-lombikot ajánlanak, melyet maximum félig tölthet meg a tesztelegy, ha rázatjuk, de csak 20 %-ban, ha nem rázatjuk. A teszt időtartama 96 óra, két ismétlés legalább szükséges. Az optimális átlagos hőmérséklet 24 °C az édesvízi fajoknál, 20 °C a tengeriekénél. A megvilágítás folyamatosan, hideg fehér fényel történjék, a fényintenzitás állandó legyen, sötét periódus csak egyes fajoknál szükséges. A pH fajfüggő: 7,5-8,0 között változhat.

A mérési végpont lehet a sejttömeg, a sejtszám, a szaporodási görbe alatti terület vagy a klorofill tartalom.

Az **algák** használata a vízi rendszerek ökotoxikológiai vizsgálatára általánosan elterjedt a világon. Talajok esetén azonban csak a talajkivonat tesztelhető. A talajkivonat algákkal való tesztelésének akkor van értelme, ha a talajban lévő kockázatos anyagról feltehető, hogy felszíni vízi ökoszisztémákat veszélyeztet. Ilyenek lehetnek a felszíni víz közeli peszticidekkel kezelt mezőgazdasági talajok vagy más szennyezett területek talajai. Az 1. táblázat az édesvízi algákkal végzett különböző célú toxicitás tesztek foglalta össze Calow (1993) nyomán.

Magyarországon az MSZ 22902/2-1989 tartalmazza a *Scenedesmus obtusiusculust* alkalmazó tesztelési módszert. Németországban a DIN 38412/33 *Scenedesmus subspicatus* író talajkivonatok tesztelésére.

1. táblázat: Édesvízi algák az ökotoxikológiában (Calow, 1993)

Vizsgált vegyület	Tesztorganizmus	A teszt időtartama
Tiszta vegyületek	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Navicula seminulum</i>	5 nap
Növényvédőszer	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Navicula seminulum</i>	5 nap
Vízoldható vegyületek	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	3 nap
Tiszta vegyületek keveréke	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	4 nap
Humán és állati gyógyszerek	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	14 nap

Az ISO 8692 (1987) standard által előírt *Selenastrum capricornutum* teszt módosításával foglalkoznak Arensberg és munkatársai (1995). Az általuk javasolt módosítás a teszt időtartamát három napról kettőre redukálná.

Ahlf és munkatársa (1991) szennyvíziszap extrakciójával nyert kivonatot vizsgálnak *Ankistrodesmus bibraianus* tesztorganizmus felhasználásával.

1.3.4. Haltesztek

A halakat más vízi gerincesek és makrogerinctelenek mellett kiterjedten használják vízi ökoszisztémák érzékenységének jellemzésére, a vízi ökoszisztémát veszélyeztető vegyi anyagok hatásának vizsgálatára. Általánosan elterjedt a halteszt peszticidek és más ipari és mezőgazdasági vegyi anyagok hatásának mérésére, valamint szennyvizek, elfolyók és veszélyes hulladékok vizsgálatára.

A vízi ökoszisztémát jellemző tesztorganizmusok beszerzése általában problémás, nehéz egészséges és állandó minőségű tesztorganizmusokhoz jutni. Néha a természetből gyűjtött, majd a laboratóriumi körülményekhez adaptált populációt alkalmazunk. Ezek főként akkor előnyösek, ha lokálisan érvényesülő káros hatásokat, pl. stresszt akarunk vizsgálni.

A halpopulációk nagymértékben eltérhetnek egymástól, ez főként ugyanannak a fajnak laboratóriumi és vad változata esetén lehet jelentős, de egyes fajok természetben előforduló populációk is különbözhetnek egymástól.

A vízminőség a másik kényes pont a haltesztek esetében. Sokan tiszta természetes vízhez igyekeznek jutni, mások speciális tisztítórendszert hoznak létre. Sokan kétszer desztillált vízből állítják elő szintetikus adalékokkal a tesztközeget, természetesen ennek mennyisége limitált. Ha mód van rá, akkor a laboratóriumot érintetlen, tisztának minősülő élővíz közelébe kell telepíteni, ahonnan korlátlan mennyiségű víz nyerhető a teszteléshez és hígítóvízként egyaránt.

A haltesztekénél jól ismert LC_{50} értéket adó toxikus anyagot használunk referenciaként, amelynek segítségével minősíthetjük a tesztrendszerünket és a tesztorganizmusunkat. A tesztrendszerben mért és kontrollált hőmérséklet, pH, vízkeménység, tengervíznél a sótartalom, megvédheti a tesztet a kudarctól, illetve a nem megfelelő körülmények miatti rossz eredménytől.

A legnépszerűbb édesvízi teszthalak a *Pimephales promelas*, a *Lepomis macrochirus*, az *Ictalurus punctatus* és az *Oncorhynchus mykiss*.

A tesztállatok kiválogatásánál arra kell törekedniük, hogy korban és méretben azonos egyedekkel dolgozzunk. Fiatal állatokat válasszunk, melyek tömege fajtól függően 0,1-5,0 g lehet. A leghosszabb hal hosszmérete ne legyen nagyobb, mint a legrövidebb kétszerese.

A tesztedény vízszintes mérete legalább háromszorosa legyen a legnagyobb állat vízszintes méretének, a mélysége legalább háromszorosa a legnagyobb állat magasságának.

A tesztoldat legalább 150 mm mély legyen a 0,5 g-nál nagyobb tömegű halak számára, és legalább 50 mm mély a 0,5 g alattiak esetében.

Naponta legalább egyszer etessük az állatokat, olyan mennyiségű és minőségű tápanyaggal, amely biztosítja a tesztorganizmus egészségét, normális anyagcseréjét.

A teszt időtartama statikus teszt esetén 96 óra, hosszabb idejű teszteknel legalább 96 óránként frissítésre van szükség, vagy átfolyásos megoldásra.

A víz hőmérséklete fajtól függően 12 °C-tól (*O. mykiss*) 25 °C-ig (*P. promelas*) változhat. A víz pH-ja a vízkeménységtől és a fajok igényétől függően 6,5 és 8,5 között változhat. A megvilágítás intenzitása általában nincs megadva, de az fontos követelmény, hogy a 16 órás megvilágítást 15-30 perc átmenettel 8 órás sötétség kövesse. Az oldott oxigén koncentráció 60-100 % között változhat.

Végpontként a pusztulás vagy a mozgásképtelenség mérhető.

1.3.5. Teratogenitás vizsgálata békaembrióval (FETAX)

A teratogenitási tesztek az utódokban jelentkező fejlődési rendellenességeket vizsgálják, amely megmutatkozhat az embrió pusztulásában, gátolt növekedésében és fejlődésében, valamint fenotípusban is jelentkező fejlődési rendellenességekben. A toxikus vegyi anyagok nagy része okozhat fejlődési rendellenességeket, hiszen az embriók érzékenyebbek, mint a kifejlett egyed. A természet általában többszörös védelemmel látja el az embriókat, de vannak olyan fajok, amelyek embriói a szabadban fejlődnek. Ilyenek a békaembriók.

Teratogenitási teszthez olyan tesztorganizmus szükséges, melynek eredményéből extrapolálhatunk az emberi teratogenitásra.

A *Xenopus laevis* békafaj az emberre is extrapolálható eredményt ad, ezen kívül számos előnnyel bír, mint tesztorganizmus. Jól ismert kísérleti állatfaj, széles körben használják genetikai és fejlődésgenetikai vizsgálatokhoz. Laboratóriumi körülmények között jól tenyészthető és fenntartható, egyszerre sok utódot hoz létre, így a kísérletekhez és mérésekhez megfelelő számú egyed áll rendelkezésünkre. További előnye, hogy az emlősökkel, a madarakkal és a hüllőkkel ellentétben az embriói a szabadban fejlődnek, így megfigyelhetőek.

A FETAX egy gyors teszt, melynek előnye, hogy emlősökre és más fajokra is extrapolálható eredményt ad viszonylag rövid időn belül. Segítségével veszélyes hulladékok valamint tiszta és keverék vegyi anyagok teratogén hatása tesztelhető. Nem csak a teratogenitás indikálására használható, hanem ökotoxicitás pontos előrejelzésére is, hiszen a gyanúsított anyagok már sokkal kisebb koncentrációban hatnak a békaembriókra, mint a felnőtt, kifejlett egyedekre, tehát igen érzékeny tesztrendszer hozható létre az alkalmazásukkal. A FETAX eljárást érzékenysége és gyorsasága miatt a teratogenitás szűrésére és kizárására lehet a legjobban használni, negatív eredmény esetén. Ha viszont teratogenitást mutat, akkor más tesztekkel és tesztorganizmusokkal is kell azt bizonyítani.

A vizsgálathoz minimum 2 éves felnőtt hímekre és 3 éves nőstényekre van szükség. A felnőtt hím 7,5-10 cm hosszú, a nőstény 10-12 cm hosszú. A felnőtt egyedeket hetente háromszor kell etetni vitaminokkal feljavított marhamájjal.

A tesztedény egy nagyméretű akvárium a tenyésztésre szánt felnőttek számára, legalább 30 cm magas, 20-30 liter térfogatú, buborékolató levegőztetéssel. Egy 40x40 cm-es akváriumban 4-6 egyed élhet.

Az embriókat Petri-csészében tartjuk és a tesztelést is abban végezzük. 10 ml tesztegyben 25 embriót helyezünk a vizsgálathoz. Az embriók a tesztelendő vegyi anyagnak állandóan, végig a teszt alatt ki vannak téve. A tesztelendő anyagot naponta ismételtelen alkalmazzuk. A teszt időtartama 96 óra. A koncentrációk száma 5, az ismétléseké legalább 2.

A tesztközeg hőmérséklete a felnőtteknél átlagosan 23 °C, az embrióknál 24 °C. 12 órás megvilágítást 12 órás sötétség követ. A pH 6,5-9 között változhat.

A végpont az akut tesztnél a pusztulás, a szubakut vizsgálatnál a teratogenitás.

1.3.6. Több fajt alkalmazó mikrokozmosz és mezokozmosz tesztek

A több fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek mesterségesen összeállított közösségeket vagy a természetből származó környezeti elemekben található közösségeket alkalmaznak. Arra mindig számítani kell, hogy mindkét esetben (akár mesterséges, akár a természetből származó) további változások következnek be az összeállított mikrokozmoszban, mindaddig, amíg a mikrokozmoszra jellemző egyensúlyok illetve állandósult állapot be nem áll.

Az ökoszisztéma teljesen hű utánzása általában nem teljesül a mikrokozmoszokban, de két vagy több egymással kapcsolatban lévő tesztorganizmus komplexebb választ ad, mint az egyfajú tesztek egyetlen tesztorganizmusa. A szubsztrátok heterogenitása és a környezet heterogenitása megközelítheti a természeteset. Egy mikrokozmosz összeállítás tulajdonképpen nem attól jó, hogy jól utánozza a valóságos környezetet, hanem attól, hogy képes megválaszolni a feltett kérdést.

A több fajt alkalmazó tesztek nagy változatosságot mutatnak méretben és komplexitásban. Néhány vízi mikrokozmosz, vagy biodegradációs teszt kisebb, mint egy liter térfogatban folyik, de hatalmas akváriumokat is alkalmaznak akár laboratóriumban, akár külső térben. Még nagyobbak a mesterséges tavak, melyek akár nagyobb, akár kisebb tározókat, szennyvíztisztító tavakat is modellezhetnek.

A szárazföldi ökoszisztémát modellező mikrokozmoszok egészen kis méretűek is lehetnek, pl. a talaj mikroflórája hatására bekövetkező biodegradáció vizsgálatára alkalmas tesztcsövek vagy tesztedények akár 100 g-os méretben is reális eredményt adhatnak. Talajból vett magminta kis méretben is megtartja az eredeti struktúráját, a talaj heterogenitását és fizikai-kémiai komplexitását.

Ugyanakkor talaj-mikrokozmosz lehet egy darab föld vagy egy kert, amely összetett növénytakaró és kisebb-nagyobb állatokat, rovarokat és emlősöket is tartalmaz. Ezek a teszterületek nagyon eltérő nagyságúak lehetnek, de általában van rajtuk növénytakaró és egy szimulált ökoszisztéma. Megfelelő elkerítéssel meg kell akadályozni a szimulált ökoszisztéma mozgékony tagjainak elvándorlását, illetve az idegenek bevándorlását. A szárazföldi mikro- és mezokozmoszok még nem mentek

át olyan fokú standardizáláson, mint a vízi ökoszisztémákat modellező mikrokozmoszok. Az agro-ökoszisztémáktól a mesterséges erdőn keresztül a mesterséges lápig sokféle céllal és sokféle megoldással jöhetnek létre.

Sokan azt állítják, hogy a túl kicsi méretű mesterséges ökoszisztémákból nem lehet jól extrapolálni a valóságos ökoszisztémára, mások viszont állítják és bizonyítják is, hogy a kis méret ellenére a természeteshez hasonló dinamikájú mesterséges ökoszisztémákat lehet létrehozni, melyek extrapoláció alapjául szolgálhatnak. A lényeg, hogy a mesterséges ökoszisztéma úgy legyen megszerkesztve, hogy az a feltett kérdésre tudjon válaszolni, a lehető legnagyobb környezeti realizmussal.

A vízi mikrokozmoszok már eléggé elterjedtek, standardizált változataik például a SAM (Standardized Aquatic Microcosm=szabványosított vízi mikrokozmosz) egységes metodikát adnak az előkészítésre, a beoltásra, az akklimatizálásra, a mintavételezésre, a mintaelemzés módszereire és az eredmények értékelésére.

1.3.6.1. Standard vízi mikrokozmosz

A standard vízi mikrokozmosz laboratóriumban összeállított, több fajt alkalmazó ökotoxikológiai teszteljárás.

Időtartama 64 nap, melynek beosztása szigorúan megadott: 1 hét előkészítés és akklimatizálás után történik a beoltás algákkal, újabb négy nap elteltével helyezik bele a makrogerincteleneket, majd 7 nap elteltével a vizsgálandó vegyi anyagot. Hetente újraoltja az algák meghatározott mennyiségével.

A tesztelendő anyagot ezután hetente vagy kéthetente ismételtlen adagolják, a mintavételeket követően.

A mikrokozmoszból hetente kétszer vesznek mintát, melyből meghatározzák az oldott tápanyagok mennyiségét és a vízkeménységet, valamint a mesterséges ökoszisztéma egyedszámait és fajeloszlását.

Pontosan előírják a mikrokozmoszba helyezendő fajok típusát és számát. Az algák meghatározott 10 fajából 10^3 darabot tesznek a szabványos méretű tesztedénybe induláskor, a többi állatfajt a 4. napon helyezik a rendszerbe. Ezek a *Daphnia magna*, a *Hyalella azteca*, valamint *Cypridopsis* (kagylósrák), *Hypotrachs* (állati egysejtű=protozoa) és *Philodina* (kerekesféreg) fajok. Egyedszámaik a fenti sorrendben: 16, 12, 6/mikrokozmosz, 0,1 és 0,03/ml.

A teszthez 4 literes üvegedényeket használnak, legalább 12 cm-es szájjal. Ezekbe az üvegedényekbe 500-500 ml tesztközeget helyeznek. A vizsgált koncentrációk száma 4, az ismétléseké 6.

Inkubátorban vagy szabályozott hőmérsékletű szobában dolgoznak, 20-25 °C között. Meleg fehér fényel világítják meg. A fényintenzitás: $80 \mu E m^{-2}$. 12 órás megvilágítást 12 órás sötétség követ. A vizes fázis mellé mesterséges üledéket tesznek, melyet kvarchomokból (200g), örölt kitinből (0,5 g) és cellulózporból (0,5

g) állítanak össze. Ebből 201 g-ot adnak minden tesztedénybe. A pH-t 7,0 értékre állítják.

Végpontként algaszámot, gerinctelen fajeloszlást, pH-t, oldott oxigénkoncentrációt és tápanyagszintet mérnek. Az eredményeket többváltozós statisztikai módszerekkel értékelik.

1.3.6.2. Kevert vízi mikrokozmosz

Homogén rendszerben, viszonylag kis térfogatban (1liter) vizsgál az angol nomenklatura szerint MFC rövidítéssel (Mixed Flask Culture) jelzett mikrokozmosz teszteljárás.

Ennél a vizsgálatnál 6 hetet szánnak a vízi közösség kialakulására, ezt az időszakot 12-14 hét vizsgálati szakasz követi.

A mikrokozmosz beoltásához a SAM-tól eltérően nem mesterségesen összeállított inokulumot használnak, hanem egy természetes eredetű törzstenyészetet. Ennek a törzstenyészetnek az előállítását 6 hónap alatt történik megadott módon, természetes eredetű közösségből indulva. Megadják, hogy a törzstenyészetnek milyen típusú és számú organizmust kell tartalmaznia: zöld algákat és kovamoszatokat, legalább egy fonalas zöld algát, legalább egy nitrogénkötő kék algát, protozoákat és makrogerinctelenekeket. A törzstenyészettel hetenként oltják a kísérleti mikrokozmoszt.

Az 1 literes tesztedénybe 900 ml Taub-féle tesztoldatot és 50 ml savval mosott homokot tesznek. 4 vizsgálati edényt használnak, 5-5 ismétléssel. 20 °C-on dolgoznak, 12 órás periódusokban világítják meg a mikrokozmoszt.

Végpontként oldott oxigéntartalmat, algasűrűséget, mikrobaszámot, légzésaktivitást, biomasszaprodukciót és a protozoa populáció összetételét vizsgálják. Többváltozós statisztikai módszerekkel értékelnek.

Az eljárás ellentmondása, hogy az inokulum céljára létrehozott törzstenyészeten belül a viszonylag nagy méret és a törzsfenntartás körülményei miatt kialakuló összetett közösség a vizsgálat során nagymértékben redukálódhat a tesztedény kis mérete és limitált fizikai-kémiai komplexitása miatt.

1.3.6.2. Szabadtéri mikrokozmosz peszticidek tesztelésére (FIFRA)

1991-ben fejlesztették ki a FIFRA mesterséges ökoszisztémát, eredetileg peszticidek engedélyezéséhez szükséges tesztelés céljára. Méretét tekintve a FIFRA a mikrokozmosz és a mezokozmosz között helyezkedik el, a kettő keveréke: 6 m³-ben működik. Ebben a méretben mód van vízi növények és halak betelepítésére és tesztelésére is, ezzel a vizsgálatba bevont trofikus szintek száma is nő, tehát szinte mindenre alkalmas, amire a sokkal nagyobb mesterséges tó jellegű mezokozmoszok. További előnye, hogy párhuzamosok és ismétlések is végezhetőek.

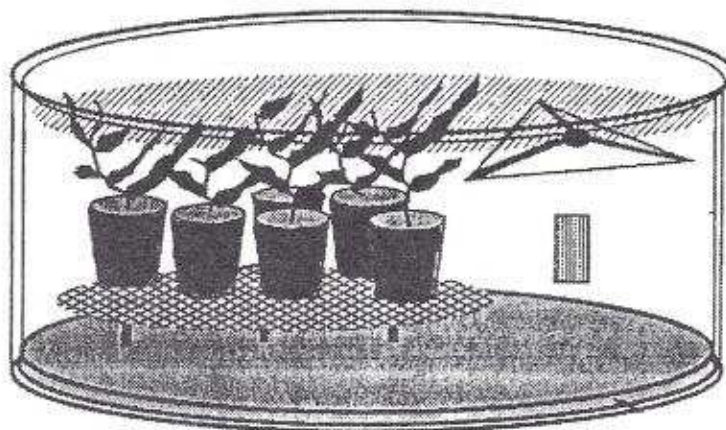
Az adatértékelés természetesen még nagyobb feladat elé állítja a vizsgálatot végzőket, hiszen a belső térben kontrolláltan fenntartott mikrokozmoszokhoz képest, ezek a szabadtéri kísérleti edények kevésbé kontrollálhatóak, jobban ki vannak téve az időjárás és a környezet behatásainak. Egyszerűnek tűnő, mégis szinte megoldhatatlan a különböző évszakokban végzett kísérletek azonos hőmérsékleten tartása. Ezen segít valamennyit, ha földbe süllyesztett tartályokat használunk.

A FIFRA rendszerben felhasznált organizmusok: fitoplankton, zooplankton makrogerinctelenek, köztük rovarok, vízi növények, halak. A halak alkalmazható mennyisége limitálva van 2 g/m^3 értékben.

A kísérleti edény szabad vízfelülete legalább 5 m^2 legyen, mélysége $1,25 \text{ m}$, térfogata 6 m^3 . Halak nélküli rendszer esetén lehet kisebb méretű is.

6-8 hetes akklimatizálási vagy érlelési idővel kell tervezni a vizsgálandó vegyi anyag adagolása előtt. A vizsgálandó anyag vízbe juttatása sem mindig egyszerű: lehet spray formájában a felszínre juttatni, törzsoldatként feloldani, majd homogénen elkeverni, vagy talajhoz keverve iszap formájában adni a tesztrendszerbe. A tesztelendő anyagot a mikrokozmosz létrehozása után 2 héttel alkalmazzák első ízben, majd a problémához illő gyakorisággal ismételt adagolást végeznek. Az alkalmazott koncentrációt vagy dózist és az ismételt adagolások számát szintén az adott cél határozza meg.

A mikrokozmosz fizikai-kémiai paramétereit is kontrolláltan kell kialakítani. A hőmérséklettartás miatt a felszín alá süllyesztett, lapos fenekű tartályt alkalmaznak, a természetes forrásból származó üledéket legalább 5 cm vastagságban rétegzik a tartály aljára helyezett tálcákba. A víznek szennyezetlen, természetes tározóból vagy tóból kell származnia, olyanból, amely ökológiailag aktív. Mennyisége nem változhat a vizsgálat során nagy mértékben, maximum $\pm 10 \%$ -ot. Az időjárási viszonyokat folyamatosan kell követni és regisztrálni a kísérlet tartama alatt.



7. ábra: Mikrokozmosz peszticidek tesztelésére (Landis and Yu, 1999)

1.3.6.4. Talaj-mikrokozmosz

Szárazföldi ökoszisztémák modellezésére szolgáló eljárás a SCM (Soil Core Microcosm = talaj magminta mikrokozmosz). Általában a xenobiotikumoknak a mezőgazdasági ökoszisztémákra gyakorolt hatását vizsgálják a segítségével.

Öszvér eljárás ez, olyan szempontból, hogy a talaj természetes eredetű, mert szabadföldről származik, onnan szállítják a laboratóriumba, hogy aztán szigorúan ellenőrzött körülmények között kísérletezzenek vele. Annak ellenére, hogy a talajunkban a természetes eredet miatt kezdetben megvan az egészséges talajra jellemző nagyfokú heterogenitás és ökológiai sokoldalúság, a laboratóriumi körülmények között az ökológiai rendszer összetettsége nagymértékben csökkenhet.

A mikrokozmosz élőlényei tehát a talaj származási helyétől függő módon, az eredeti ökoszisztémát tükrözik.

A tesztedény mérete egy magmintának megfelelő, 17 cm átmérőjű, 60 cm mély műanyagcső, amely zavartalan talajmintát tartalmaz. A magminta lefedésére az álló helyzetű műanyag hengerben lévő talaj tetejére homogenizált talajból fedőréteget tesznek, majd a talajjal töltött hengert egy belső szűrőréteggel ellátott Büchner-tölcsérbe helyezik. Általában a vegyi anyag 3 koncentrációját vizsgálják.

A Büchner-tölcsér összegyűjti a csurgalékvizet. A talaj locsolása és a csurgalékgyűjtés a vizsgálandó anyag adagolása előtt, majd minden további adagolás előtt történik.

A teszt időtartama 12 hét vagy több. A hőmérsékletet mérni és szabályozni szükséges. A megvilágítás és a locsolás a talaj eredetének megfelelően történjék.

Végpontként szinte végtelen számú lehetőségünk van. A csurgalék fizikai-kémiai-biológiai vizsgálata, a talajból vett minták összetett fizikai-kémiai-biológiai analízise, a kísérlet végén pedig a teljes talaj mindenre kiterjedő vizsgálata: fajok száma, eloszlása, biodegradáció, bioakkumuláció, biotranszformáció, stb.

2. Ökotoxikológia és a vegyi anyagok kockázata

Az ökotoxikológiai teszteknek különösen fontos szerepük van a vegyi anyagok környezeti kockázatának felmérésében.

A vegyi anyagok a környezetbe kerülve az ökoszisztémát és benne az embert veszélyeztetik. A veszélyeztetés sokkomponensű bonyolult folyamat eredménye, melynek mértéke nem határozható meg egyszerűen. Egy viszonylag új tudományág, a kockázatfelmérés a kockázat nagyságát mérőszámmal igyekszik jellemezni. Ehhez integráltan használja a geológia, az ökológia, a vegyésztudományok, a biológia, a matematika, a fizika legújabb ismereteit.

A kockázatfelmérés, vagyis a veszély mérőszámmal való jellemzése rendkívül fontos összehasonlítás és a prioritások megállapítása esetében. A kockázat felmérés szolgáltatja a tudományos alapot a gyakorlati környezetvédelemhez és a környezetvédelmi politikához is. Az egységes környezeti kockázatfelmérési módszerek kidolgozásán és bevezetésén tudósok, környezetvédők és politikusok munkálkodnak.

2.1. A környezeti kockázat

A **kockázat**, valamely károsnak ítélt jövőbeni esemény bekövetkezésének valószínűsége. Mértéke a bekövetkezés valószínűségétől és a kár nagyságától függ.

A környezeti kockázat abból adódik, hogy az ökoszisztéma és az ember a természetbe kikerült veszélyes, kockázatot jelentő anyagnak **ki van téve** és az **hat rá**.

A **vegyi anyagok** a környezetbe kerülve az ökoszisztémában nehezen becsülhető változásokat hoznak létre, egyensúlyok eltolódását, a fajeloszlás megváltozását, gyakran egyes fajok teljes kipusztulását, s ezzel helyrehozhatatlan károkat okoznak.

A xenobiotikumok mindig fokozott veszélyt jelentenek az ökoszisztémára, mert kezdetben ismeretlenek a velük kapcsolatba kerülő élőlények számára. Anyagcseréjük, enzimszisztémájuk még nem alkalmazkodhatott a szennyezőanyaghoz, rezisztenciát sem alakíthattak ki, sem a biodegradációra nem készülhettek fel. A xenobiotikumnak nem minősülő vegyületek és az elemek is komoly kockázatot jelenthetnek az ökoszisztémára, ha a normálistól eltérő koncentrációban és eloszlásban kerülnek a környezetbe.

A környezetet szennyező **vegyi anyagok káros hatásának** felméréséhez mennyiségi és minőségi információ szükséges a szennyezőanyagról, az érintett környezeti elemekről, az ökoszisztémáról, valamint a szennyezés időbeni lefolyásáról.

A toxikológusok a vegyi anyagok okozta károkat főleg az ember, néha egy-egy kiemelt, veszélyeztetett faj szempontjából vizsgálják. Utóbbira példa a peszticidek esete, amikor mérik és megadják a szer halakra vagy méhekre gyakorolt toxikus hatását, hogy alkalmazáskor ezt figyelembe lehessen venni. A toxikológusok általában olyan testorganizmusokon mérik a vegyi anyagok, például az új, szintetikus

vegyületek akut és krónikus toxicitását, vagy mutagén és teratogén hatásait, melyek alapján az emberre lehet extrapolálni. Ez sem mindig egyszerű feladat, hiszen egyik élőlény fajról egy másikra extrapolálás rengeteg háttér-információt igényel, és egy sor hibalehetőséget rejt magában.

Az **ökoszisztéma** egészére vonatkozó kockázat még az ember eseténél is sokkal összetettebb, a hatások és kölcsönhatások eredője valóban csak becsülhető. A helyes becslést az érintett terület jellegzetességeinek, a vegyület vagy elem tulajdonságainak, viselkedésének és hatásainak, valamint a környezeti elemek tulajdonságainak ismerete teszi lehetővé.

A szennyező **vegyi anyag hatására** bekövetkező változások teljes meghatározása az ökoszisztéma minden faját, egymáshoz viszonyított arányát és a szezonális változásokat is figyelembe véve rendkívül bonyolult és költséges feladat. Az ép, érintetlen ökoszisztéma szabályszerű viselkedését sem ismerjük részleteiben. A törvényszerűségek komplex felderítésére egy-két kiterjedt projekt folyik a világban, amikor több kutatócsoport vizsgálja éveken át a kijelölt területet, a trofikus lánc minden faját.

A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a szennyezőanyagok sosem vagy nagyon ritkán fordulnak elő egymagukban. Általában több szennyező, de nem ritka, hogy szennyezők százai fordulnak együttesen elő, melyek kölcsönhatásai egymással és a környezeti elemekkel valamint az ökoszisztéma tagjaival követhetetlen szövevényt alkotnak, melynek felderítésére és változásainak mérésére nem elegendők a fizikai vagy kémiai módszerek.

Az **ökotoxikológia** mindkét problémára megoldást kíván nyújtani. Viszonylag egyszerű ökotoxikológiai tesztekkel méri a hatást, majd ezekből az eredményekből extrapolál a teljes ökoszisztémára. Hasonlóan, ahogy a patkányokon végzett kísérletekből a humán toxikológus extrapolál az emberre.

Az ökotoxikológiai tesztek véghezjuttathatók tiszta vegyi anyagokkal vagy környezetből származó szennyezett mintákkal, tehát megállapíthatjuk egyes vegyi anyagok ökotoxicitását, de megadhatjuk a víz, az üledék, talaj vagy levegőminták ökotoxicitását, leggyakrabban hatást még nem mutató koncentrációban vagy dózisban kifejezve.

2.1.1. Vegyi anyagok kockázatának számszerű jellemzése

A vegyi anyagok kockázatának mérése és számszerű jellemzése (**ERA** = Environmental Risk Assessment) a környezetvédelemmel kapcsolatos döntések tudományos alapjául szolgál, akár környezettechnológiai, akár gazdasági, akár irányítási, akár politikai-jogi területről legyen szó. Egy-egy példával szeretném megvilágítani a kockázat felmérésének és mérőszámmal való jellemzésének szükségességét és alkalmazását.

A veszély mértékét a **kockázati tényezővel (RQ = Risk Quotient)** jellemezzük. **A kockázati tényező az előre jelezhető környezeti koncentráció (PEC =**

Predicted Environmental Concentration) és az ökoszisztémára **előre jelzés szerint károsan még nem ható koncentráció (PNEC = Predicted No Effect Concentration)** hányadosa. Minél nagyobb ez az érték, annál nagyobb a veszély, amit a környezetbe került vegyi anyag jelent. Ha ez az érték kisebb, mint **1**, nincs szükség beavatkozásra, ha nagyobb, mint **1**, további vizsgálatok szükségesek. Ha a részletesebb vizsgálatok eredményeinek figyelembevételével is nagyobb, mint **1**, akkor el kell kezdeni a kockázatcsökkentés lehetőségein és megoldásain gondolkozni.

A kockázatot tehát számszerűsíteni kellett ahhoz, hogy értékelésre és összehasonlításra tudjuk használni. A számszerű érték képzése kockázatfelmérés során történik, melynek lépései az alábbiak:

- a veszély ill. veszély forrásának azonosítása,
- a kitétségi, a környezeti koncentráció felmérése a terület ismeretében,
- a hatás ismerete és mennyiségi meghatározása,
- a kockázat becslése,
- a kockázat jellemzése.

2. táblázat: A kockázati tényező értéke és a megfelelő veszélyeztetési szintek

RQ = PEC/PNEC	Veszély
< 0,001	elhanyagolható
0,001 – 0,1	kicsi
0,1 - 1	enyhe
1 - 10	nagy
> 10	igen nagy

A környezeti kockázat jellemzésére tehát a **kitétséget (expozíció) és a hatást** kell összevetnünk, s viszonyukból, arányukból a kockázat nagyságának jellemzésére mérőszámot alkotni. A kockázat felmérés céljából az ember és/vagy az ökoszisztéma veszélyeztetettségének megállapítását jelölhetjük meg. A környezeti kockázatfelmérés általános célja annak megállapítása, hogy a megfigyelt vagy mért szennyezőanyag koncentráció elfogadhatatlan kockázatot jelent-e a környezetre, az emberre.

2.1.2. A vegyi anyagok általános és helyspecifikus kockázata

A vegyi anyagok kockázatát az anyag hatásterületére kell meghatározni. Általánosan használt és nagy mennyiségben gyártott anyagok (pl. felületaktív anyagok, szénhidrogének) hatásterülete nagyobb régió, esetleg az egész Föld. Ilyen esetekben, a kockázatot a nagyobb régióra, például Európára jellemző átlagértékek felhasználásával számítjuk ki. Ugyanennek az elterjedten használt vegyi anyag a lokális kockázata is kíváncsiak lehetünk, például kiemelten érzékeny területek, vagy védendő fajok esetében. Ilyenkor a helyspecifikus környezeti paraméterekkel végezzük a

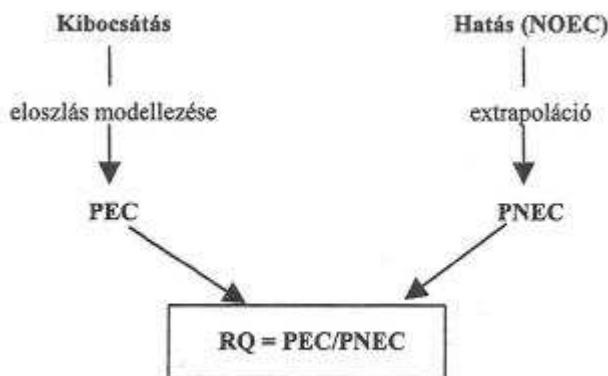
számítást és a helyspecifikusan jellemző kölcsönhatásokat és területhasználatokat veszünk figyelembe. Kis hatásterületű lokális szennyezettség, például szennyezett területek, illegális hulladéklerakók, balesetek esetében csak a lokális kockázatot fogjuk meghatározni, a lokálisan érvényes szennyezőanyag tulajdonságok, környezeti paraméterek és területhasználatok figyelembe vételével. Pontos kockázatfelméréshez tehát a lokálisan érvényes információkat be kell szerezni, a jellemzőket, a környezeti állapotot fel kell mérni.

A szennyezett területek másik problémája, hogy általában kockázatos anyagok keverékei szennyeznek. Az RQ értéke egyetlen vegyi anyagra határozható meg. Több vegyi anyag kockázata összeadódhat, de ezek az értékek nem mindig additívak. Problémát jelent az is, hogy a szennyezőanyagok egy része nincs is azonosítva.

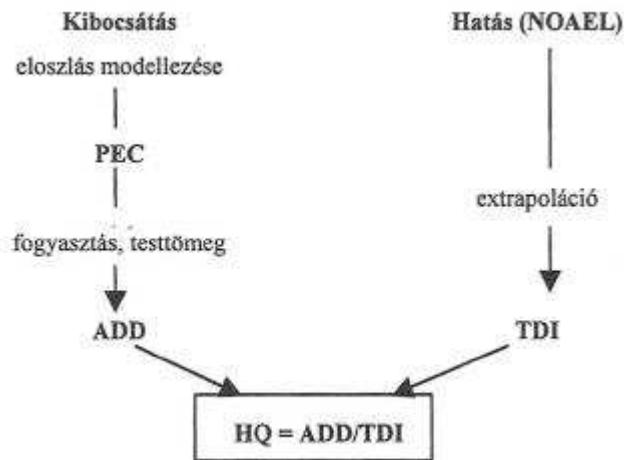
2.2. A kockázat mérésének alapja

Az anyagok kockázatának megítélése mindig a **kitettség** és a **hatás** összevetésén alapul. A kockázat számszerűsítéséhez a környezetben valószínűsíthető kockázatos anyag koncentrációt és hatását, helyesebben az előreláthatóan hatást még nem mutató koncentrációt kell egymással összevetnünk, vagyis a **PEC / PNEC** hányadost meghatározni.

A köztudatban elterjedt és általunk is használt kifejezések közül a kockázat mérés, a kockázat felmérése és a kockázat becslése ugyanazon folyamatot jelölik, vagyis az ábrán látható séma szerinti koncentrációk illetve dózisok meghatározását és hányadosuk képzését. A „becslés” kifejezés használatát az indokolhatja, hogy mind a PEC, mind a PNEC, mind pedig a TDI (Tolerable Daily Intake = elfogadható napi bevitel) meghatározásánál közelítő számításokat, modellezést, extrapolációt alkalmazunk, tehát becsljük az értékeket; pesszimista becslést alkalmazunk.



8. ábra: A kockázatfelmérés folyamatábrája környezeti kockázat esetén



9. ábra: A kockázatfelmérés folyamatábrája emberi egészségkockázat esetére

Az emberi egészségkockázat számszerűsítéséhez a PEC értékből az átlagpopuláció statisztikai adatai felhasználásával határozzák meg az ADD (Average Daily Dose = átlagos napi dózis) értéket, melyet a TDI-hez viszonyítva képezzük a HQ (Human Risk Quotient) kockázati értéket.

Ezzel az eljárással tehát a kockázat két koncentráció, vagy dózis hányadosaként értelmezett dimenzió nélküli szám, egy mérőszám, mely értelmezhetően, abszolút értékben adja meg a kockázat nagyságát (RQ és HQ).

A *kockázat* kifejezés magában foglalja azt, hogy a kockázatos anyag találkozik a környezettel és egy adott vagy feltételezett környezetre hat. A vegyi anyag önmagában is veszélyes, mert gyúlékony, mérgező, stb., a veszély akkor is fennáll, ha még elő sem állítottuk. A kockázat kifejezés viszont csak a környezettel, a receptorokkal együtt értelmezhető.

2.2.1. A környezet kitétsége, a PEC érték meghatározása

Az adatbázisokból származó és/vagy a mért értéktől a származtatott PEC értékhez úgy juthatunk, hogy figyelembe vesszük:

- a szennyezőanyag tulajdonságait,
- vízoldhatóságát,
- megoszlási hányadosait,
- molekulatömegét,
- (bio)degradálhatóságát,
- bioakkumulálhatóságát,
- a szennyezett közeg hatását,
- a kockázatos anyag mozgását a környezetben,

- az adszorpció mértékét,
- a hozzáférhetőségét,
- a kibocsátás helyétől milyen távolságban mértünk, stb.

A környezet kitétsége a mért értékek és/vagy a kibocsátásból kiinduló számítások alapján állapítható meg. A forrásból induló transzport során a vegyi anyag eléri a környezeti elemeket és a receptorokat. Ezt az útvonalat terjedési modellek alapján, számítógépes programmal is szimulálhatjuk. A szennyezőanyag terjedésének valósághű modellezéséhez ismernünk kell a szennyezőanyag és a környezet jellegzetességeit, hogy a kölcsönhatásokat helyesen ítélhessük meg.

A környezeti koncentráció (PEC), azaz a kitétség meghatározásának lépései:

- A transzport folyamatok leírása,
- eloszlási modellhez szükséges minimális adathalmaz beszerzése,
- a környezet definiálása, lokális és/vagy regionális szinten,
- másodlagos adatok beszerzése: megoszlási hányadosok a környezeti elemekben, a degradáció mértéke (biotikus, abiotikus),
- a degradáció toxikus közti- vagy végtermékének figyelembevétele,
- a kibocsátás felmérése, vagy becslése,
- aloszlás és viselkedés a környezetben,
- PEC számítása.

A **PEC** számításához szükség van a szennyezőanyag fizikai-kémiai tulajdonságaira, mint pl.: mólsúly,

oktanol-víz megoszlási hányados,
szorpciós tulajdonságok,
vízoldhatóság,
gőznyomás,
illékonyosság,
forrpont.

Egy szennyezett terület esetében a forrásból kiindulva modellezhetjük a szennyezőanyag terjedését. A forrás lehet maga a szennyezett terület is.

2.2.2. A koncentráció – válasz összefüggés

A környezetünket veszélyeztető anyagok megítélése hatásuk alapján történik. Ez a hatás lehet toxikus, mutagén, teratogén vagy más káros hatás. A dózis - válasz összefüggés vizsgálata és értékelése megmutatja számunkra a kockázatos anyagok egészségkárosító hatásának mértékét, s azt a koncentrációt vagy dózist, amely még nem okoz észrevehető hatást a vizsgált testorganizmuson. A káros hatást még nem mutató koncentrációk illetve dózisok megjelölésére az ökológiai kockázat és a humán egészségkockázat esetében más és más jellemzőket alkalmaznak az ökotoxikológusok és a humántoxikológusok.

2.2.2.1. Az emberre károsan nem ható koncentráció

Az emberre károsan még nem ható kockázatos anyag koncentrációt extrapolációval határozzuk meg toxikológiai adatok alapján. A humántaxikológusnak széleskörű adatbázis áll rendelkezésére, s kialakult annak a módszere is, hogy állatokkal végzett kísérletek eredményéből, a NOAEL értékek alapján faktoriális módszerrel hogyan határozzák meg az ember számára még elviselhető, tolerálható dózist, abból kiindulva pedig a még elviselhető napi bevitelt (TDI = Tolerable Daily Intake). A TDI a lenyelés vagy bőrkontakt útján a szervezetbe jutó mennyiséget jelenti, belégzés esetén a toxikus anyag levegőben mért tolerálható koncentrációjához, az ún. referencia koncentrációhoz hasonlítunk (RfC = referencia koncentráció).

A kockázatos anyaggal kapcsolatos információkat kézikönyvekből és adatbázisokból gyűjtjük ki. Fontos, hogy az ADD (átlagos napi dózis = ÁND) értékeket validált forrásokból szerezzük be.

2.2.2.2. Az átlagos napi dózis, vagyis a kitettség meghatározása

Az átlagos napi dózis (ADD) a szervezetbe került kockázatos anyag mennyiségét jelenti egységnyi testtömegre és időegységre vonatkoztatva. Mértékegysége: mg/kg*nap.

$$ADD = Ck * BM * EG / TT$$

Ck = kockázatos anyag koncentrációja a szennyezett közegben (mg/kg)

BM = lenyelt, bevitt mennyiség (kg/nap)

EG = expozíció gyakorisága (nap/év)

TT = testtömeg (kg)

Szennyezett területek esetében az ADD értéket minden szennyezőanyagra ki kell számítani. Az átlagos napi dózis meghatározásánál megkülönböztetünk gyermeket, nőt, férfit. Az expozíció becsléséhez átlagos vagy helyspecifikus fogyasztási értékeket használhatunk. A fogyasztás értékein kívül ismerni kell a helyben természet élelmiszerek részarányát, a területhez kötődő tevékenységformákat, területhasználatokat. Az expozíció időtartama is helyspecifikus tényező.

Az TDI és RfC értékekhez, mint referenciaértékhez hasonlítjuk a becsült expozíció mértékét. A kettő hányadosa az egészségkockázati hányados, a HQ.

$HQ = ADD / TDI$ = átlagos napi dózis / tolerálható napi dózis (lenyelésre)

$HQ = IC / RfC$ = belégzett koncentráció / referencia koncentráció (belégzésre)

Az összes szennyezőanyagra és az összes expozíciós útra kiszámított RQ vagy HQ értéket össze kell adni, így kapjuk meg az érintett populációra vonatkozó összes kockázat mértékét.

A kockázati tényező (RQ, HQ) az előre jelezhető környezeti koncentráció és az előreláthatólag károsan még nem ható koncentráció hányadosa. Ebből a definícióból adódóan az egynél nagyobb kockázati hányados már komoly kockázatot jelent. 0,1

és 1,0 között enyhe mértékű a kockázat. Általában az $RQ = 1$ értékhez tartozó $PEC = PNEC$ alapon a környezeti koncentráció a károsan még nem ható koncentrációval azonos lehet. De vegyük figyelembe, hogy ekkor már az enyhe és a nagy kockázat határán vagyunk.

A toxikus hatásokból adódó kockázati tényezőkön kívül a mutagén és karcinogén hatásokból eredő kockázatot is figyelembe kell venni.

$$\sum_{1}^n HQ = \sum_{1}^m HQ \quad n = \text{expozíciós utak}, \quad m = \text{szennyezőanyagok}$$

2.2.2.3. Az ökoszisztémára károsan nem ható koncentráció, PNEC

Az érintett ökoszisztémára károsan még nem ható koncentráció egyes tesztorganizmusokkal folytatott vizsgálati eredményekből kapható meg extrapolálással.

Ha egy toxikus szennyezőanyag kikerül a környezetbe, az messzemenő következményekkel jár. Az ott élő ökológiai közösség egyes tagjait, egyes fajait háttérbe szorítja, sőt kipusztulásukat is okozhatja, másokat előnyhöz juttat, tehát felborítja az ökoszisztéma egyensúlyát.

Az ökoszisztémák kisebb-nagyobb mértékben képesek alkalmazkodni a környezet változásaihoz, néha extrém környezeti tényezőkhöz is képesek idomulni, meg tudnak felelni a klimatikus változásoknak és a legkülönbözőbb stresszeknek. Az ökológiai közösség egyes tagjai érzékenyebben reagálnak a környezeti hatásokra, mások rezisztensek. Egyes környezeti hatások csak a közösség tagjainak arányát tolják el, mely bármikor visszaalakulhat, de történhet irreverzibilis károsítás is.

Az ökotoxikológusoknak az ökoszisztémát jól reprezentáló és annak történéseit jellemző tesztorganizmusokra és mérési módszerekre van szükségük.

- A bioindikáció a vizsgált ökológiai rendszer legérzékenyebb tagjának meglétét, vagy hiányát vizsgálja,
- a biomonitoring a monitor-szervezetekben lejátszódó változásokat, pl. akkumulációt,
- az ökotoxikológiai tesztek laboratóriumban végzett vizsgálatok, egy, vagy több fajt alkalmazó tesztek, a koncentráció hatás görbe kimérésére.
- Adott terület diverzitásának vizsgálata (pl. életközösségek, koreloszlás, egyedszám, egyedsűrűség, egészségi állapot, szaporodási ráta, stb.), a biodiverzitás eltérése a háttér területtől.

A PNEC érték meghatározása ill. kiszámítása az adatbázisokban elérhető adatok értékelésével kezdődik. Az adatbázisok a legtöbb vegyületre hiányosak. A meglévő eredmények legtöbbször rövid idejű, tehát akut toxicitási tesztből származik.

Az adatbázisokban található adatok lehetnek akut, vagy krónikus hatáson alapuló tesztek, amelyek végpontja is különbözhet. Ha az adatbázisban nem találunk egy

vegyületre adatot, akkor a szerkezet hasonlósága alapján becsülhetjük a toxicitását, hasonló szerkezetű ismert hatású vegyület adataiból (QSAR).

Az ökotoxikológiai vizsgálatok, azok értékelése és a kapott eredmények felhasználása során sok a hibalehetőség.

- Fajonkénti nagy eltérések miatt, nehéz egyik fajra kapott eredményből egy másikra következtetni.
- Az akut toxicitás méréseiből nem mindig lehet a hosszabb ideig tartó (krónikus) hatásokra következtetni.
- A laboratóriumi mérésekből csak nagy hibával lehet a valódi ökoszisztémában lezajló történésekre következtetni, ennek okai
 - hogy egyetlen faj nem reprezentálja az ökoszisztémát,
 - tiszta vegyületekre kapott adatok nem veszik figyelembe az additív, szinergens, vagy antagonistá hatásokat, a szennyezőanyag és a mátrix kölcsönhatását, stb. (Horváth és munkatársai, 1996).

A PNEC érték megállapítására alkalmazott ökotoxikológiai tesztek eredményét az elvégzett tesztek számától és minőségétől függően biztonsági faktorokkal vesszük figyelembe. Ez az ún. faktoriális módszer. Az EU-TGD (1996) javaslat felsorolja a különböző környezeti elemek esetén használatos tesztorganizmusokat és megadja a biztonsági faktorok alkalmazásának rendjét. Az 3. táblázat bemutatja a PNEC képzéséhez ajánlott faktorokat vízi ökoszisztéma tesztorganizmusaival nyert ökotoxikológiai eredmények alapján.

3. táblázat: A PNEC érték becsléséhez alkalmazott biztonsági fatorok

Ökotoxikológiai tesztelés	Biztonsági faktor
Három különböző trofikus szint élőlényeivel legalább 1-1-akut toxicitási teszt (LC ₅₀ : hal, alga, Daphnia)	1000
Legalább egy hosszú távú NOEC mérés akár hal, akár Daphnia	100
Két különböző NOEC mérés, két különböző trofikus szint élőlényeivel (hal és/vagy alga és/vagy Daphnia)	50
Három trofikus szint élőlényeivel meghatározott krónikus NOEC értékek	10
Szabadföldi adatok, vagy mezokozmosz kísérletek egyedi felmérés	1

2.2.2.4. Az ökológiai kockázat pontosítása, iterációs megközelítés

A veszély a **PEC / PNEC** hányadossal jellemezhető; minél nagyobb az **RQ** érték, annál nagyobb a vegyi anyag által okozott veszély. Ha a hányados kisebb, mint 1, nincs további teendő, nincs szükség a felmérés pontosítására vagy intézkedésre. Ha az **RQ** nagyobb, mint 1, annak két oka lehet: vagy valóban nagy a kockázat, vagy fölébecsültük, amiatt, hogy adathiányos állapotból indítottuk a kockázatfelmérést, és pesszimista gondolkodást követtünk, vagyis mindig, amikor nem volt pontos adatunk, vagy információnk, a lehető legrosszabb esetet vettük figyelembe.

A 10. ábra a környezetünkben már megtalálható és újonnan keletkező vegyületekre mutat be egy általános kockázatfelmérési eljárást. A módszer a következő lépéseket tartalmazza:

- **PEC / PNEC** arány meghatározása a meglévő adatok segítségével.
- Ha a **PEC / PNEC** arány nagyobb, mint 1, meg kell nézni, hogy a **PEC** illetve a **PNEC** értékének pontosításával csökkenthető-e **PEC / PNEC** arány. Ehhez további információra illetve vizsgálatokra van szükség.
- További információ beszerzése, újabb vizsgálatok elvégzése.
- **PEC / PNEC** arány módosítása.

A lépések átgondolása során pesszimista gondolkodásmódot kell alkalmazni. Ha bizonytalan az információnk, rossz minőségű vagy nincs adatunk, akkor a lehető legrosszabb esetet vegyük alapul. Ha a pesszimista becslés ellenére $RQ < 1$ értéket kapunk, biztosak lehetünk benne, hogy joggal minősítjük a vegyi anyagot vagy a területet enyhe veszélyességűnek, további intézkedésekre nincs szükség.

A 10. ábrán bemutatott iterációs eljárás végeredménye alapján megállapítható, hogy szükségesek-e kockázatmentesítő lépések. Az iterálást akkor hagyhatjuk abba, ha az adatok pontosításával már nem csökkenthető a kockázati tényező. A pontosítással minimalizált kockázati tényező a vegyi anyagra illetve a területre jellemző kockázat kvantitatív eredménye. Összefoglalva ismét megadjuk a kockázatfelmérésben használt extrapolációval kapott értékeket kitettségre és hatásra.

Ökológiai kockázat esetén:

RQ = kockázati tényező, az előre jelezhető környezeti koncentráció (**PEC**) és az előreláthatólag károsan még nem ható koncentráció (**PNEC**) hányadosa

PEC = kitettség, a környezetben valószínűsíthető kockázatos anyag koncentráció

PNEC = az ökoszisztémára károsan még nem ható szennyezőanyag koncentráció

Humán egészségkockázat esetén:

HQ = ADD / TDI = átlagos napi dózis / tolerálható napi dózis (lenyelés, bőrkontakt)

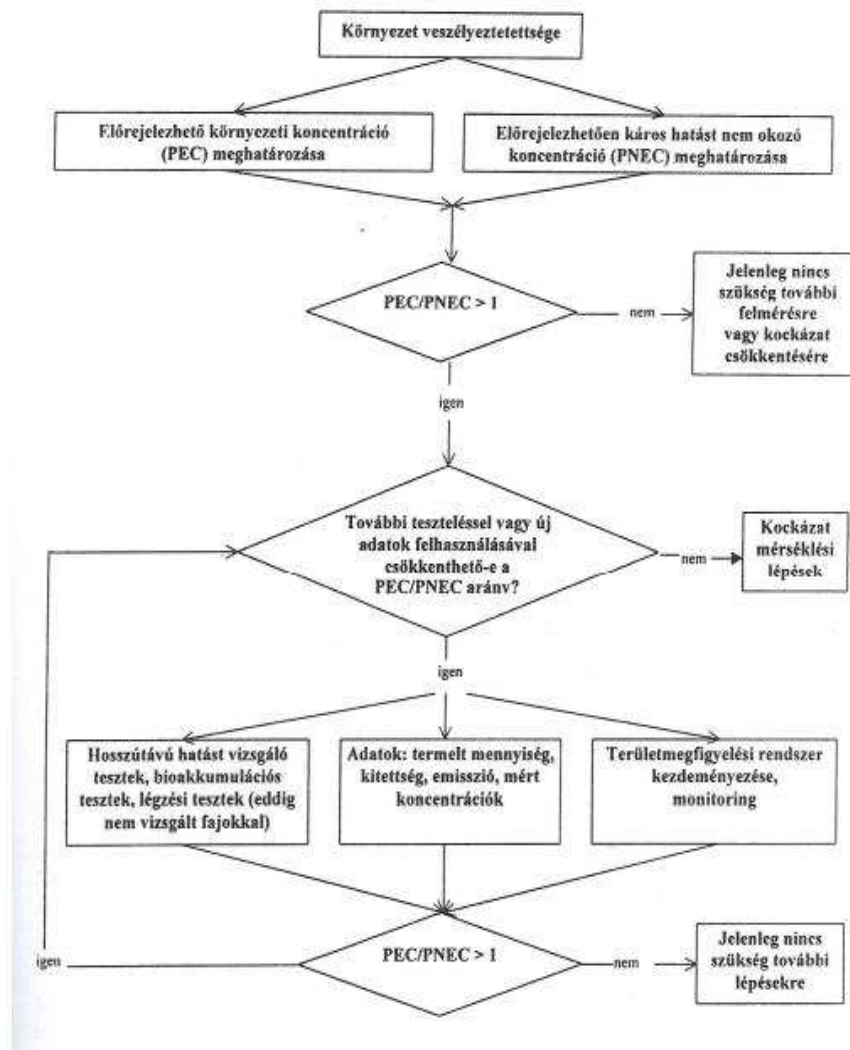
ADD = átlagos napi dózis, mértékegysége: $mg/kg \cdot nap$

TDI = megengedhető napi bevitel, mértékegysége: $mg/kg \cdot nap$

$HQ = IC / RfC$ = belélegzett koncentráció / tolerálható napi koncentráció (belégzés)

IC = belélegzett koncentráció

RfC = referencia koncentráció, amelyre vonatkoztatva értékeljük a belégzés útján bekövetkező terhelést.



10. ábra: Általános kockázatfelmérési eljárás iterációval

Az ökológiai kockázat esetében is összeadjuk a különböző szennyezőanyagok és expozíciós utak miatti kockázatokat. Amennyiben információnk van arról, hogy az additivitástól eltérően, szinergizmus vagy antagonizmus várható a hatásokban, akkor azokkal módosíthatjuk az eredményt.

$$\sum_{i=1}^n \text{ERQ} + \sum_{j=1}^m \text{ERQ} \quad n = \text{expozíciós utak}, \quad m = \text{szennyezőanyagok}$$

2.2.2.5. A bioakkumuláció

A PNEC kalkulálásánál igen fontos a bioakkumuláció figyelembe vétele. A bioakkumuláció felelős a táplálékláncba kerülésért.

Bioakkumulációval kell számolnunk a szerves anyagok egy részénél, pl. a nehézfémeknél és a nehezen bomtható (perzisztens) apoláros szerves vegyületeknél.

- A biokoncentráció a vízi környezetből való felvétel nettó eredménye, vagyis valamely vegyületnek egy organizmus által felvett és leadott értékek különbsége,
- a bioakkumuláció minden felvételi lehetőséget figyelembe vesz,
- a biomagnifikáció a bioakkumuláción kívül a szennyezőnek a táplálékláncon keresztül történő transzportját is jelenti.

A biokoncentrációs faktor (BCF) az organizmusban mérhető koncentráció és környezeti elemekben mérhető szennyezőanyag koncentráció aránya.

$$\text{BCF}_{\text{növény}} = C_{\text{növény}} / C_{\text{talaj}}$$

A szerves vegyületek biokoncentrációs faktora arányos az oktanol-víz megoszlási hányadosokkal. (4. táblázat)

4. táblázat: A biokoncentrációs faktor és az oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow}) értékeinek összefüggése szerves vegyületeknél

Bioakkumulációs hajlam	BCF	log K_{ow}
nagy	>3	>3
közepes	1,5 – 3	1,5 - 3
kicsi	<1,5	<1,5

Egy sor biológiai faktor miatt természetesen eltérések lehetnek a K_{ow} és BCF értékek között. Ennek okai a következők lehetnek:

- az aktív transzport,
- a vegyület megváltozhat a membránon átkerülve,
- kölcsönhatásba léphet bizonyos sejtanyagokkal,
- a felvétel és kiürítés kinetikája és jellegzetességei.
- emiatt a magas K_{ow} értéken kívül a bioakkumuláció akkor valószínűsíthető, ha a vegyület erősen adszorbeálódik, ha rokon vegyületeiről ismert bioakkumulálhatósági hajlamuk, valamint ha nehezen hidrolizálhatóak és rosszul biodegradálódnak.

A bioakkumulációs teszteknel figyelembe kell venni magát, a mérési eredményekből számított BCF-t, a kiürülés idejét (CT_{50}), az anyagcsere utakat, a transzformációt a sejten vagy az organizmuson belül, a szervspecifikus akkumulációt, a kiürítetlen megkötött maradékot és a vegyület hozzáférhetőségét.

Élelmiszerek toxikus anyag koncentrációja

$$PEC_{\text{hal}} = PEC_{\text{víz}} \times BCF_{\text{hal}}$$

$$PEC_{\text{növény}} = PEC_{\text{talaj}} \times BCF_{\text{növény}}$$

PEC_{hal} vagy $PEC_{\text{növény}}$ értékeket a tápláléklánc felsőbb tagjai, például a csúcsragadozók kockázatának megállapítására a $PNEC_{\text{oral}}$ ragadozó értékkel kell összevetni a fogyasztott mennyiség ismeretében.

Az ember veszélyeztetettségének jellemzésére ADD (átlagos napi dózis) értéket kell számítani a hal és növényi koncentrációk alapján, a fogyasztás és a fogyasztó jellemzőinek figyelembevételével, és azokat az ember még tolerálható táplálkozással történő beviteli (TDI_{oral}) értékeivel összevetni.

2.3. Vegyi anyagok általános kockázatfelmérése, határértékképzés

Az olyan vegyi anyagok gyártásának és használatának engedélyeztetéséhez, melyeket nagy mennyiségben állítanak elő, és felhasználásuk során is számíthatunk nagyobb mennyiség környezetbe kerülésével, elengedhetetlen az előzetes ökotoxikológiai tesztelés. A vegyi anyag előre jelezhető koncentrációját kell összevetni az ökoszisztémára előreláthatóan károsan még nem ható koncentrációjával.

Az előre jelezhető károsan még nem ható koncentráció ($PNEC$) tulajdonképpen nem más, mint egy hatáson alapuló határérték. Sok országban a vegyi anyagok határértékeit, a környezeti minőségi kritériumokat a vegyi anyagok hatása alapján állapítják meg. Egy ország rendeleteibe bekerülő hatáson alapuló határérték, mondjuk felszíni vizek esetében nem egy konkrét felszíni vízre, hanem az országra jellemző „átlagos” felszíni vízre, azaz egy fiktív felszíni vízre érvényes. Ezt a határértéket alkalmazzák minden felszíni vízre, holott szigorúan véve egyik konkrét felszíni vízre sem igaz. Egységes európai határértékek az európai átlagkörnyezetre vonatkoznak, tehát csak iránymutatóul használhatóak, ha helyspecifikus értékelést vég-

zünk. Lokálisan egészen más érték adódhat a PNEC-re (előrejelzés szerint károsan még nem ható koncentráció), mint a törvényes szennyezettségi határérték.

Általános kockázatfelmérésről akkor beszélünk, ha nincs megadva a konkrét, terület, hanem például egy állam rendeleteibe készülő általános határérték képzéséhez szükséges a kockázat számszerűsítése.

Általános, hatáson alapuló határértékek képzésénél, a multifunkcionalitás igénye miatt, az ökotoxikológiai hatásokból indulunk ki, és az ökoszisztémára vonatkozó PNEC érték lesz a határérték, természetesen megkülönböztetve a vízi és a szárazföldi ökoszisztémákat.

Helyspecifikus határértékképzés során egy konkrét területre érvényes PNEC értéket határozzunk meg. Ilyenkor a konkrétan ismert területhasználatokból indulunk ki, hiszen a területhasználat egyértelműen meghatározza az expozíciós útvonalakat. Ha a felszín alatti víz ivóvízbázis, akkor az ivóvíz minőségi kritériumokat tekintjük károsan még nem ható koncentrációknak (PNEC, TDI).

Mind általános, mind helyspecifikus kockázat esetén igaz az alábbi összefüggés:

$$PEC / PNEC = RQ \leq 1,$$

vagyis, az RQ-nak egynél kisebbnek kell lennie. Ezt az összefüggést kétféleképpen is alkalmazhatjuk: ha ismerjük a területhasználatokból adódó expozícióknak megfelelő PNEC értéket, akkor ahhoz megadhatjuk a maximálisan megengedhető PEC, azaz környezeti koncentráció értéket. Ha ennél nagyobb a pillanatnyi érték, akkor a számított PEC a kockázatsökkentő eljárás célértékét is jelenti. A másik irány, ha ismerjük a környezeti koncentrációt, az $RQ \leq 1$ kritérium alapján megválaszthatjuk azt a területhasználatot, amely nagyobb PNEC-et tesz lehetővé (korlátozás a területhasználatban)

Egy nagy mennyiségben gyártott peszticid, a trifluralin példáján mutatjuk be a vegyi anyagok általános kockázatának számszerű meghatározását és a határérték-képzés metodikáját ökotoxikológiai adatok alapján. A trifluralinra a magyarországi rendeletekben nem szerepel határérték.

2.3.1. A trifluralin kockázata a Duna ökoszisztémájára

A **trifluralin** Magyarországon nagy mennyiségben gyártott és importált peszticid. 1996-os statisztikai adatok szerint

- Gyártott mennyisége: 184 t/év
- Importált mennyisége: 70 t/év.

A trifluralin apoláros szerves vegyület, nehezen biodegradálható, vízben rosszul oldódik, és ezért jól adszorbeálódik a szilárd szerves anyagokon, pl. humuszanyagokon. Valószínűsíthető, hogy a felszíni vizekbe kerülve a felszíni víz lebegőanyagához kötődik, majd az üledékben halmozódik fel. Az üledék mélyebb rétegeiben anaerob körülmények közé kerülve, egyre kevesebb az esélye a biodegradálódásra. Tehát egyike azon vegyületeknek, melyek hajlamosak kémiai időzített bomba kép-

zésére. Az üledék adszorpciós kapacitását, a trifluralin rossz vízoldhatóságát és rossz biodegradálhatóságát figyelembe véve az üledékben évekig is megkötve lehet anélkül, hogy ott különösebb problémát okozna, mindaddig, amíg, a külső körülmények megváltozása el nem indítja a kioldódását és a táplálékláncba kerülését. Gondoljunk egy olyan egyszerű esetre, mint az áradás. A felszíni víz üledéke a parti területek talajára rakódik. Az addig hozzáférhetetlen, erősen kötődő szerves vegyület az aerob körülmények, a nedvesedés és kiszáradás váltakozása és a növényi gyökerek kioldó hatása révén a táplálékláncba kerül.

A környezeti koncentráció becsléséhez mindenhol, ahol nincs konkrét statisztikai vagy mérési adatunk, az Európai Technikai Irányelveket (EU-TGD, 1996) vesszük alapul, de megjegyezzük, hogy az európai adatok használatával hibát követhetünk el, így az iteráció második lépésében pontosabb, Magyarországra jellemző adatok beszerzésére lehet szükség. A trifluralint gyártó üzemtől nem kaptunk információt a kibocsátási faktorokról, így az európai irányelv peszticidekre vonatkozó javaslatát fogadtuk el.

- Kibocsátás gyártás során szennyvízbe: $F_{vz} = 0,02$
- Kibocsátás felhasználás során felszíni vízbe: $F_{vz} = 0,1$.

Az EU irányelvekben található kibocsátási faktorok azt adják meg, hogy a gyártás ill. a felhasználás során a peszticid milyen hányada kerül a szennyvízbe illetve a felszíni vízbe. Ezek az értékek olyan táblázatokból olvashatóak ki, melyek a vegyület illékonyágát, vízoldhatóságát és a szerves anyagokon való megkötődését is figyelembe veszik. Ezek a táblázatok minden környezeti elemre megadják az oda jutó hányadot, így talajra is.

Felszíni vizet érő trifluralin terhelés, PEC számítása

A termelésből adódó terhelés: $184 \text{ t/év} * 0,02 = \mathbf{3,6 \text{ t/év}}$, ha nem lenne szennyvíztisztító telep a gyártó üzemhez kapcsolva. Ha definitíve van szennyvíztisztító, akkor az F_{stp} értékkel szorozva, ennél kisebb terhelést fogunk kapni. $F_{stp} = 0,14$ esetén $\mathbf{0,5 \text{ t/év}}$ terhelés értékkel kalkulálhatunk. A Magyarországon gyártott és felhasznált mennyiséghez regionális becslés esetén hozzáadódik a szlovák, osztrák és német eredetű terhelés, amit ebben a példában nem vettünk figyelembe.

- Termelésből adódó terhelés = $3,6 \text{ t/év} * 0,14 = 0,5 \text{ t/év}$
- Felhasználásból származó terhelés = $253 \text{ t/év} * 0,1 = 25,5 \text{ t/év}$

A magyarországi termelést és felhasználást alapul véve a felszíni vizeket érő teljes trifluralin terhelés: $25,5 + 0,5 = \mathbf{26 \text{ t/év}}$

A trifluralin koncentráció még átlageloszlást feltételezve és a hígulásokat ismerve sem számítható közvetlenül ebből a mennyiségből, mert a felszíni vizekbe kerülő szerves anyag egy része elbomlik. A biodegradációra vonatkozó irodalmi adatok figyelembe vételével a trifluralin nehezen, de azért biodegradálódik vízben, ezért biodegradációs faktorát $F_{deg,vz} = 0,5$ értéknek vehetjük. A Duna áramlási sebességét

és a trifluralin biodegradálhatóságát figyelembe véve a regionális környezeti koncentráció:

$$PEC_{\text{regionális,víz}} = \text{terhelés} * F_{\text{deg,víz}} : Q = 26 \text{ t/év} * 0,5 : 2204 \text{ m}^3/\text{sec}$$

$$PEC_{\text{regionális,víz}} = 1,9 * 10^{-4} \text{ mg/lit}$$

$$Q = \text{a Dunára jellemző átlagos áramlási sebesség} = 2204 \text{ m}^3/\text{sec}.$$

Mivel Magyarországon a fő vízgyűjtő a Duna, ezért a teljes felszíni vízbe kerülő trifluralin szennyezést a Dunára terheljük, hiszen előbb-utóbb valóban oda kerül. Ha lokális becslést végeznék, akkor a főbb gyártókhöz kapcsolódó vízgyűjtőkre kellene terhelni a gyártott mennyiségeket.

Az eddigi lépéseknél jól megfigyelhetjük az elhanyagolásokat és a becsléseken alapuló számításokat. Ha volna mérési adatunk a biodegradáció mértékére, és ha ismernénk a konkrét befogadó felszíni vizet, akkor nem átlagértékekkel, hanem a **mért értékekkel** végeznénk a számítást. A kockázat felmérése során tett elhanyagolásokat ill. közelítéseket jegyezzük fel, hogy a kockázatfelmérés első lépésőjének végeztével emlékezzünk, hogy mely lépéseknél lehetne pontosítani. Az iteráció során tehát a becsült értékeket kell pontosítanunk, mérés vagy információgyűjtés révén. Ismételt számítással kerülhetünk közelebb a legvalószínűbb kockázati tényezőhöz. Ez a folyamat során mindig a kockázati tényező csökkentését jelenti, hiszen mindvégig a legrosszabb esetet vettük alapul, vagyis pesszimista becslést végeztünk.

A víz trifluralin koncentrációjából becsüljük az üledék koncentrációját.

$$PEC_{\text{regionális,üledék}} = PEC_{\text{regionális,víz}} * K_{\text{oc}} * f_{\text{oc}}$$

$$PEC_{\text{regionális,üledék}} = 1,9 * 10^{-4} \text{ mg/lit} * 10^4 * 0,2 = \mathbf{0,38 \text{ mg/kg}}$$

f_{oc} = a Duna üledékére jellemző szerves szén hányad,

$\log K_{\text{ow}} = 4,8-5,3$ (oktanol-víz megoszlási hányados logaritmus), ebből

$K_{\text{oc}} = 6\ 500 - 13\ 400 \text{ lit/kg}$, átlag: $1 * 10^4 \text{ lit/kg}$ (a trifluralinnak az üledék szerves széntartalma és a víz közötti megoszlási hányadosa)

A trifluralin hatása az ökoszisztémára, a PNEC érték becslése

Az ökoszisztéma egészére károsan nem ható koncentráció, vagyis a PNEC érték megbecsülhető az ökoszisztéma egyes tagjaira kapott eredményekből. Az irodalomban trifluralinra talált ökotoxikológiai adatokból (5. táblázat) a legkisebb koncentrációértéket vesszük alapul, abból fogjuk az extrapolációt faktoriális módszerrel elvégezni.

Három különböző trofikus szintről eredő krónikus tesztek állnak rendelkezésünkre, ekkor az egyezményes faktor értéke = 10. A legkisebb NOEC érték 0,001. Ezt osztjuk a faktor értékével, azaz 10-zel. A trifluralin vízben még toxikus hatást nem mutató előrejelezhető koncentrációja tehát

$$PNEC_{\text{víz}} = \mathbf{0,0001 \text{ mg/lit.}}$$

5. táblázat: Trifluralin toxicitása vízi szervezetekre: irodalmi adatok

Organizmus	Hatás	Koncentráció [mg/l]	Fajok száma
Alga	EC ₅₀	2,5 -	1
Crustacea	LC ₅₀	0,05 - 12,0	9
Crustacea	NOEC	0,004 -	1
Hal	LC ₅₀	0,010 - 1,0	6
Hal	LOEC	0,005 - 0,02	2
Hal	NOEC	0,001 - 0,002	2

Ellenőrzésképpen hatáson alapuló vízminőségi kritériumokat (határérték) kerestünk. Dán és finn kutatók egyaránt 0,0001 mg/lit határértéket javasoltak trifluralinra, ezzel az általunk képzett határérték jó egyezést mutat.

6. táblázat: Trifluralin ökotoxicitása üledéklakóra: irodalmi adatok

Organizmus	Paraméter	Koncentráció [mg/kg]	Fajok száma
Rovar	EC ₅₀ (96 óra)	3,0 -	1
Crustacea	EC ₅₀	0,6 -	1
Egyéb	EC ₅₀ (96 óra)	0,6 -	1

Üledéklakóra igen kevés irodalmi adatot találtunk. 1000-es faktort kell alkalmaznunk, mert gyenge az információs alapunk, mindössze három akut teszt eredménye áll rendelkezésünkre, három különböző trofikus szintről. Az így kapott $PNEC_{\text{üledék}} = 0,0006$ mg/kg. A mérési eredmények kis száma miatt ez a becsült érték nem reális. Ezt az értéket további számítások alapjául nem tartottuk alkalmasnak, ezért a jobb minőségű, vízre számított és elfogadott, hatáson alapuló értékből az üledék PNEC értékét a megoszlási modell alapján adjuk meg.

A megoszlási hányados alapján becsült érték reálisabb, a továbbiakban ezt alkalmazom a kockázat jellemzésére.

$$PNEC_{\text{üledék}} \text{ (mg/kg)} = K_{oc} \text{ (l/kg)} * PNEC_{\text{víz}} \text{ (mg/lit)} * f_{oc}$$

$$PNEC_{\text{üledék}} = 6400 \text{ (13 400)} * 0,0001 * 0,2 = \mathbf{0,12 - 0,27 \text{ mg/kg}}$$

6400 - 13 400 az üledékminőségtől függő K_{oc} érték.

A trifluralin kockázati tényezője Duna vízében és üledékében

A kockázat jellemzésére a környezeti koncentráció és a hatást még nem mutató koncentráció hányadosát használjuk. Ez víz és üledék esetén így számítható:

$$RQ_{\text{víz}} = \frac{PEC_{\text{víz}}}{PNEC_{\text{vízk}}} = \frac{1,9 \cdot 10^{-4}}{1,0 \cdot 10^{-4}} = 1,9 \text{ NAGY KOCKÁZAT}$$

$$RQ_{\text{üledék}} = \frac{PEC_{\text{üledék}}}{PNEC_{\text{üledék}}} = \frac{0,38}{0,27-0,12} = 1,4 - 3,2 \text{ NAGY KOCKÁZAT}$$

Ez azt jelenti, hogy a trifluralin ma az egyik olyan nagy mennyiségben gyártott vegyi anyag Magyarországon, mely a felszíni vizek, köztük a Duna üledékében nagy kockázatot jelent. A trifluralin a Duna monitorozandó paraméterei között nem szerepel, felszíni vízre, üledékre határértéket a rendeletek nem írnak elő.

A kockázati tényező pontosításának lehetőségei

A kockázati tényező pontosítási lehetősége ebben az esetben az általánostól a helyspecifikus felé történő elmozdulás, helyspecifikus adatok beszerzése, mérésekkel való meghatározása. Az alábbi teendők lehetnek szükségesek:

- A gyártó(k) pontos helyének meghatározása.
- A technológiák kibocsátási faktorainak kimérése, vagy ezekről információ beszerzése.
- A gyártott és felhasznált mennyiség évről évre történő követése.
- A trifluralin terjedési útvonalának felderítése,
- a befogadók és kapcsolódó vízgyűjtők feltérképezése,
- az alkalmazási területek feltérképezése.
- Az érintett felszíni vizek áramlási viszonyainak és a hígulások felmérése.
- Az érintett üledék típusának, szervesanyag tartalmának felmérése.
- A felszíni vízben és az üledékben folyó valós biodegradáció felmérése.
- A Duna-üledék ökoszisztémájának közvetlen tesztelése és érzékenységeknek megállapítása,
- Dunára specifikus határérték képzése.

A kockázat csökkentésének lehetőségei is azonnal adódnak a kockázatfelmérési sémára visszatekintve. Ezek:

- A gyártott és felhasznált mennyiség csökkentése,
- Szennyvíztisztító telep alkalmazása a gyártási technológiához
- A felhasználási technológia kibocsátásának csökkentése.

Ebből a példából levonható tanulságok, hogy a kockázatfelmérés akkor közelíti meg a valóságot, ha jó minőségűek a kiindulási adatok. A terjedési modellek

segítik a gondolkodást, de a **forrás - útvonal - cél** kijelöléséhez pontos információkra van szükségünk. A Duna vizének vagy üledékének mérési adataiból, vagyis a jelenleg létező monitoring rendszer adataiból nehéz visszafelé extrapolálni a forrásra. Nem is célszerű. **A mérésnek a forráshoz minél közelebb kell történnie**, így jó minőségű kiindulási adatokból végezhetjük a becslést. Lehetőleg mindig lokális becslést végezzünk, melyhez lokális kiindulási, pl. monitoring adatokat használunk. Ahhoz pedig helyspecifikus monitoringrendszer működtetése szükséges.

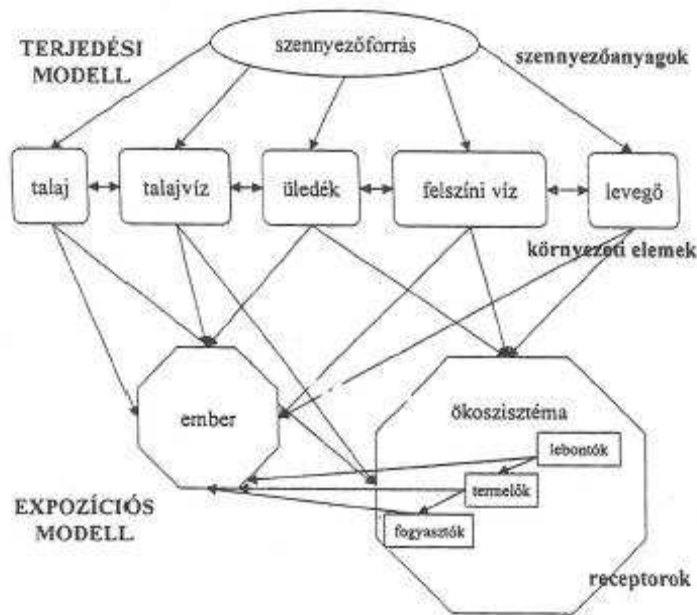
2.4. Szennyezett területek kockázata és egyedi határértéke

Kockázatos anyagok környezeti kockázatának mennyiségi meghatározása akár általános, akár helyspecifikus, azonos alapokon nyugszik. Konkrét szennyezett területek esetén a forrás-útvonal-expozíció-receptorok mentén végigmenve az általánostól a területspecifikus felé haladva pontosíthatjuk a kockázatfelmérést. Az elején, adathiányos állapotban közelítő számítást végzünk, nem helyspecifikus adatok felhasználásával. Információ hiányában konzervatív gondolkodásmódot követve mindig a legrosszabb esetet kell figyelembe venni. Például, ha bizonytalan hogy a talaj típusa agyag vagy homokos agyag-e, akkor a felszín alatti vízre nagyobb kockázatot jelentő, kevésbé vízzáró talajt kell alapul venni a számításainkban, és akkor nem fogjuk alábecsülni a létező kockázatokat. Ilyen esetben az adatok pontosításával csökkenthető a kockázat becslő értéke.

Más a helyzet a statisztikai adatok felhasználásával, hiszen ott a területre igaz érték felfele és lefele is eltérhet a statisztikában szereplő regionális (országos vagy európai) átlagtól, tehát az átlagértéket használva alábecsülhetjük a helyi kockázatot. Ebből is látszik, hogy milyen fontos a konkrét szennyezett környezet jellemzőinek, a lokálisan érvényes területhasználatok, a helyi szokások ismerete.

2.4.1. Az integrált kockázati modell

A 11. ábra bemutatja az integrált kockázati modell szerkezetét egy olyan általános megoldást, mely minden lehetséges utat feltüntet. Az általános modell minden egységét tovább lehet részletezni. Az integrált modell a kockázatcsökkentési és az un. kármentesítési technológiákat is determinálja (talajtisztítás, víztisztítás).



11. ábra: Szennyezett területek integrált kockázati modelljének elvi felépítése

Egy szennyezett terület kockázatának felmérése nem más, mint egy kockázatos anyag környezetre, környezeti elemekre és az emberre gyakorolt káros hatásának jellemzése, értékelése. A szennyezett területek egyik legnagyobb problémája, hogy gyakran kockázatos anyagok keverékei szennyeznek.

A kockázatcsökkentés sürgőssége abszolút értékben meghatározható a kockázat kvantitatív mérőszáma segítségével. A kockázat mérőszáma az előre jelezhető környezeti koncentrációt az emberre és az ökoszisztémára károsan még nem ható koncentrációhoz viszonyítja. A károsan még nem ható koncentráció érték integrálja magába a területhasználatokból adódó expozíciókból adódó hatásokat.

A kockázat jellemzésénél és kiszámításánál a kockázatos anyag potenciális forrásától a környezetbe kerülés utáni lehetséges terjedési útvonalakon végigmenve kell eljutni a receptorig, vagyis a környezeti elemeken keresztül a veszélynek kitett célszervezetekig, az ökoszisztéma tagjaiig és az emberig.

A kockázatos anyag káros hatásainak ismeretében a „forgatókönyv” eredményeképpen valószínűsíthetjük a veszély létezését akkor is, ha nem számszerűsítjük. A hatások ismeretében mondjuk ki bizonyos kockázatos anyagokról, hogy azok általában kockázatosak. Ezeknél a kockázatos anyagoknál minőségi kritériumokat igyekszünk megadni irányelvekben, útmutatókban vagy rendeletekben.

A környezeti kockázat általánosan, regionálisan és helyi szinten egyaránt jellemezhető mennyiségileg, vagyis mérőszámmal. A kockázat mérőszámához egy becslési algoritmus segítségével juthatunk

A **kibocsátás mérése** azt jelenti, hogy a kockázatos anyag levegőbe, szennyvízbe, felszíni vízbe vagy talajba kikerült mennyiségét határozzuk meg egy gyártási technológia, raktározás, felhasználás, hulladékként történő lerakás, vagy egy szennyezett területen való jelenlét esetén. Ez a részletes feltárás része.

Az **expozíció**, vagyis a kitettség felmérése a kibocsátás pillanatától addig terjed, amíg a szennyezőanyag el nem éri azt a környezeti elemet, mellyel az ökoszisztéma tagjai és az ember kapcsolatba kerülhet. Ez a terjedés vizsgálat eredménye.

A **hatást** a szennyezőanyagnak kitett organizmus és a szennyezőanyag találkozásakor lehet mérni, amely lehet *in vitro* vagy *in vivo* metodika (laboratóriumi teszt, monitoring, bioindikáció). Ez a kockázatfelmérés kiindulási alapja.

A kockázatos anyagokat a szennyezés megtörténte nélkül is lehet jellemezni **veszélyességük** alapján. A kockázatos anyag, a potenciális szennyező **kockázatának** felmérése során figyelembe vesszük a potenciálisan érintett hatásterületet is. A kockázat e szerint lehet globális, vagyis az egész Földet érintő, de lehet kisebb-nagyobb régiókra vonatkozó vagy lokális.

A **veszély azonosítása** a kockázatos anyagok káros hatásának ismeretében történik, a vegyi anyag környezetre veszélyt jelentő tulajdonságainak megfogalmazását jelenti (pl. toxicitás, mutagenitás, biodegradálhatóság, bioakkumulálhatóság, eloszlási, terjedési jellemzők).

A **veszély felmérése vagy általános kockázatfelmérés** annak a káros hatásnak a mérése, melyet a kockázatos anyag a környezet elemeire, a vízre, a talajra, az üledékre, az ökoszisztémára és az emberre gyakorol. Egy bizonyos kockázatos anyag okozta veszélyt speciális terület (szcenárió) meghatározása nélkül is megállapíthatjuk, egy átlagos vagy általános scenárió figyelembevételével.

A veszély felméréséhez szükséges adatok:

- a vegyi anyag kibocsátott mennyisége az egyes környezeti elemekben,
- a kockázatos anyag sorsa, viselkedése a környezetben, és
- a kockázatos anyag hatásaira vonatkozó információk.

A kockázat felméréséhez az előzőeken kívül szükséges még:

- a környezet alapos jellemzése,
- a kölcsönhatások jellemzőinek ismerete,
- a területhasználatok és
- a területhasználatból adódó expozíciós útvonalak feltérképezése.

A helyspecifikus kockázat kiszámításánál figyelembe kell vennünk

- az adott szennyezett terület konkrét hidrogeológiai viszonyait,
- ökológiai jellemzőit,

- a helyi területhasználatok jellegzetességeit,
- a helyi populáció összetételét,
- a helyi szokásokat.

2.4.2. A helyspecifikus kockázat mennyiségi felmérése

A kockázatelemzés annak a valószínűségnek a megállapítását jelenti, hogy egy kockázatos anyag fog-e okozni a jövőben káros változásokat a környezet valamely elemében vagy az emberben. Részletes adatokra van szükségünk mind a kockázatos anyagot, mind pedig az érintett környezetet illetően, így ismernünk kell a kibocsátási faktorokat, az expozíció nagyságát és időtartamát, valamint az ökológiai, toxikológiai hatásokat. Szennyezett területek esetén, a jövőbeli kockázaton kívül a már bekövetkezett károkkal is számolnunk kell, tehát a pillanatnyi állapotból kell kiindulni. Tulajdonképpen a szennyezés teljes történelmét kell felgöngyölítenünk és a kockázat változását a térben és az időben megadni.

A kockázati tényezőt meg kell határozni kockázatos anyagokként, környezeti elemekként és az expozíciós utaktól függően a receptorokig. A legérzékenyebb receptort kell alapul venni, és rá vonatkoztatva összegezni a kockázatos anyagok közötti különböző expozíciókat. Egy nehézfémekkel szennyezett területen élő óvodás gyermek kitettsége esetén például össze kell adni az ólom, cink, réz, kadmium, stb. fémeknek a szájon át a talajjal, a táplálékkal, a vízzel bevitt mennyiségéből, a bőrkontaktból adódó és belégzés miatti kockázatait. Hasonlóan, az ökoszisztémára vonatkozó különböző kockázatokat is összegezni kell.

$$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m HQ_{n,m} \quad \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m RQ_{n,m}$$

n = a kockázatos szennyezőanyagok száma m = az expozíciós utak száma

2.4.3. Kockázatos anyagok keverékeinek környezeti kockázata

A egyes szennyezőanyag szélsőséges esetének tekinthető a teljesen ismeretlen összetételű szennyeződés. Teljesen ismert vegyes szennyeződés aligha létezik. Egy vegyes szennyeződést tartalmazó felmért és még fel nem mért terület csak a meghatározatlanság mértékében különbözik. Ennek ellenére a legtöbb ismeretlen szennyezőanyagot tartalmazó hulladék, talaj, vagy más környezeti elem esetében is a kémiai megközelítést alkalmazzák. Ezzel a módszerrel a PEC oldal csak részben (az ismert szennyező komponensek esetében) pontosítható, a PNEC pontosítását viszont nem csak az adatbázisok hiányosságai fogják limitálni, hanem a kémiailag nem azonosított, vagy nem azonosítható anyagok figyelembe nem vétele.

Ha a egyes szennyeződést tartalmazó mintát (talajt, szennyvizet, iszapot, stb.) **ökotoxikológiai tesztelésnek** vetik alá, akkor az eredmények alapján faktoriális, vagy valószínűségi rendszer segítségével becsülhető az ökoszisztémára károsan még nem ható koncentráció. Ezen az elven alapuló döntéstámogató rendszer született is

szennyvizekre az USA-ban (US EPA) és Dániában (Dán EPA), talajokra pedig Németországban (DECHEMA, 1995).

A szennyezett területek ökotoxikológiai tesztelése segítségével a régi, ismeretlen, sokkomponensű, kémiaiilag kimutathatatlan vagy az állapotfelmérési programban nem szereplő toxikus hatású anyagok jelenlétére is fény derülhet.

A vegyes szennyeződésű területek kvantitatív kockázatfelmérésének tehát komoly korlátokat szabhat a szennyeződés komponenseinek azonosíthatatlansága és az analitikai programból való hiánya. Ezért kiegészítésül, mintegy kizáró bizonyítékképpen ilyen területek esetében mindenképpen szükséges az állapotfelmérés olyan integrált megoldása, mely a fizikai-kémiai módszerek mellett ökotoxikológiai tesztek is alkalmaz. Amennyiben a kémiai analitikai eredmények alapján, vagy a bizonyított hozzáférhetetlenség miatt magasabb egyedi határértéket engedélyeznének, akkor célszerű három trofikus szintről származó tesztorganizmussal laboratóriumi ökotoxikológiai tesztek végezni, és ha a teszteredmények is alátámasztják azt, hogy a megemelt határérték valódi „káros hatást még nem mutató” érték, akkor megfelelő a biztonság. Természetesen monitoring rendszer felállítása mindenképpen szükséges.

2.4.4. A remediáció célértéke (D)

A magyar környezetvédelmi jogi háttér régi szennyezett területekkel kapcsolatban a kockázatsökkentési intézkedések eredményeképpen kockázatfelmérésen alapuló egyedi célérték, az ún. kármentesítési szennyezettségi határérték (D) megállapítását követeli meg (33/2000 (III. 17.) Kormányrendelet). Ez azt jelenti, hogy minden egyes szennyezett területre el kell végezni a kockázatfelmérést a terület-használatoktól függő expozíciós útvonalak figyelembevételével. Tehát tulajdonképpen az expozíciók figyelembevételével meghatározunk egy PNEC értéket és az $RQ \leq 1$ kritérium alapján ennek megfelelő PEC értéket, mint remediálási célértéket kezeljük.

Mind az ökoszisztéma, mind pedig az ember esetében biztonsági faktorok alkalmazásával extrapolált értékeket használunk. Ökoszisztémák esetében a PNEC (Predicted No Effects Concentration) maga a szennyezettségi határérték, ember esetében a NOEL (No Observable Effects Level) értékből lehet meghatározni a tolerálható napi felvételt (TDI= Tolerable Daily Intake). Ehhez hasonlítva értékeljük az ökológiai kockázat esetében a PEC-ként (előrejelzett környezeti koncentráció) kifejezett kitettséget, humán egészségkockázat esetében pedig az ADD (átlagos napi dózis), vagy a nem átlagos, hanem területhasználat-specifikus napi dózis értéket.

Ma már a legtöbb európai országban tudományos alapon hozzák létre a környezetpolitika és a jogi szabályozás céljait szolgáló határértékeket és minőségi kritériumokat. A rendeletekben szereplő hatáson alapuló határértékeket mindig átlagos ökoszisztémát és átlagos fogyasztású embert vesz figyelembe. Az egyes országokban az átlagos fogyasztás statisztikák és mérések alapján határozható meg. Természetesen ez a mindenkire érvényes érték senkire sem érvényes. Gondoljunk csak a

halfogyasztásra. Magyarországon legtöbbször csak karácsonykor vesznek halat, a magyarországi átlagos halfogyasztás nagy részét valószínűleg a halászok és a hobby-horgászok fogyasztják. Az ó napi átlagos halfogyasztásuk tízszerese, vagy százszorosa is lehet az átlagosnak. Tehát egy Tisza menti halászfalu lakossága esetén a halfogyasztásból adódó kockázatot tízszeres vagy százszoros értékkel kell figyelembe venni, ez a halban akkumulálódó anyagok miatt a területspecifikus határérték nagyságában nagyfokú csökkenést fog eredményezni, hiszen a nagyobb helyspecifikus kockázathoz szigorúbb határérték tartozik.

Ha a szennyezőanyag kevésbé mobilis formában van jelen, akkor nem a kockázat hatás oldala változik, hanem a környezeti koncentráció, mert a stabilan megkötött, immobilis, felvehetetlen formát nem vesszük figyelembe a PEC érték megadásakor. Nem könnyű eldönteni ennek jogos határát, hiszen a környezeti elemekben, legfőképpen pedig a talajban játszódó dinamikus folyamatok hatására az, ami ma immobilis, az holnap már felvehetővé válik, hiszen a talajban, a kőzetekben kötött elemek folyamatos felszabadítása a talaj immanens tulajdonsága.

2.4.5. Többféle szennyezőanyaggal szennyezett terület kockázata

Szennyezett területek esetén általában nem egyetlen kockázatos anyag szennyezi a területet, hanem szennyezők keveréke, nagyon gyakran nem azonosított és kémiai analitikai módszerekkel nem definiálható összetételű szennyezők.

A szennyezett területekre az is jellemző, hogy létezésükről, történetükről már tudunk, mert felmérések, *ad hoc* vizsgálatok legtöbb esetben már történtek. Ez azt jelenti, hogy vannak kiindulási adatok, melyek a kockázat különböző célú és részletességű jellemzéséhez szükségesek.

A szennyezett területek kockázatának felmérésére a világon mindenütt többlépcsős eljárásokat alkalmaznak, mely felmérési lépések részletességben és pontosságban különböznek egymástól. Az előzetes felmérések általában kevés adatból, adathiányos állapotból kiindulva igyekeznek jellemezni a kockázatot. Az előzetes kockázatjellemzés mind kvalitatív, mind kvantitatív kockázatfelmérs esetén megelőzheti a részletes vizsgálatot.

Előzetes felmérés leggyakoribb célja, hogy kizárhassunk területeket a további vizsgálatokból. Ennek feltétele, hogy pesszimista becslést végezzünk, és hogy a veszély egy bizonyos határ alatt legyen. Szennyezett területek kockázatának felmérése során **kvalitatív**, azaz relatív **kockázatbecslést** is szoktak alkalmazni olyan esetekben, ha több terület vizsgálatáról és rangsorolásáról van szó. A rangsorolás a kockázat és az intézkedési sürgősség szempontjából történik. Ilyenkor a rangsoroláshoz megfelel a relatív vagy kvalitatív kockázatbecslés, amikor pontszámokkal, vagy más, konkrét értelemmel és dimenzióval nem rendelkező mutatókkal jellemezzük a szennyezett területet. Természetesen ilyenkor is a - veszélyforrás, transzport, cél – „forgatókönyvet” kell követnünk, de csak a kitettség és hatás tényét regisztráljuk, a mértékét nem. Az ily módon nyert pontszámok csak az azonos módon felmért területek egymáshoz viszonyítására alkalmasak.

2.4.6. Régi, elhanyagolt szennyezett terület kockázata és célértéke

Régi, elhanyagolt területek kockázatának megítélése még bonyolultabb feladat, mint a vegyes szennyeződésű területeké. Általában ezeken is vegyes szennyeződés található, de ezt még tetézik az illegális lerakások és az ökoszisztéma adaptálódása miatt megnövekedett elemforgalom és a táplálékláncba való bevitel. Az elhanyagolt-ság miatt az ilyen területeken lerakott hulladékot úgy kell tekinteni, mint ami 100%-ban kikerült a környezetbe, tehát nem egy kibocsátási faktorról kell figyelembe venni, mint egy viszonylag izolált szennyezőforrást.

A régi szennyezett területek esetén kellemes meglepetés is érheti a kockázatfelmérést végző szakembert, legalábbis ha a lokális érdekeket veszi figyelembe. Ha a szennyeződés utánpótlás már megszűnt, mert az évek során tovaterjedt és nagyobb területet szennyezve hígulással eltűnt, vagy a szennyeződés terjedés lecsengő szakaszában van, a felszín alatti víz veszélyeztetettsége is csökkenő tendenciát mutat. A talaj mikrofórája a hosszú évek során megtanulta hasznosítani a szerves szennyezőanyagot energiaforrásként, szép lassan elfogyasztotta, először a könnyebben bomlókat, majd, ha volt elég ideje a nehezebben bomlókat is. A természet adaptálódóképessége igen nagy, a fajok egymáshoz viszonyított arányának folytonos változásával mindenféle szennyezőanyaghoz képesek alkalmazkodni, így elég hosszú idő elteltével spontán öntisztulás indul és folyik a szennyezett talajokban. A talajoknak ezt a tulajdonságát ismerve a régi szennyezett területek felmérésekor mindig meg kell vizsgálni ennek az öngyógyító természetes folyamatnak az állását, és azzal harmonikus, azt támogató technológiákat kell alkalmazni.

A hosszú időn keresztül elhanyagoltság fordított eredménnyel is zárulhat, például olyan nem degradálódó szennyezőanyagoknál, mint a toxikus fémek. Bányászati hulladékok, meddőanyagok, fémtartalmú meszes csapadékok, galvániszapok környezetbe kerülésük kezdetén a hulladékot alkotó mátrix tulajdonságai miatt (gyakran lúgos pH-júak, karbonátok, vagy hidroxidok, mésztartalmúak, nyers, feltáratlan kőzetek, stb.) nehezítik vagy lehetetlenné teszik a toxikus fémek mobilizációját. De ez az immobilizáló hatás nem örök, hiszen a talajok több okból is folyamatosan savanyodnak, fizikai-kémiai és biológiai mállásnak köszönhetően, egyre jobban feltárodnak és fémtartalmuk mobilizálódik. Ez azt jelenti, hogy a kezdetben káros hatást alig mutató szennyezett talajban a toxikus fémek kockázata egyre nagyobb lesz.

A krónikus kockázatokat szigorúbban kell megítélni, mint az akut kockázatokat. Krónikus kockázatokért felelős kockázatos anyagokkal - ólom, kadmium, benz(a)pirén, PAH-ok - szennyezett területek esetében nem szabad érzékeny terület-használatokat engedélyezni, olyanokat, ahol nagy az expozíció.

2.5. Szennyezett területek állapotfelmérése és monitoringja

Szennyezett területek állapotfelmérésére és monitoringjára integrált fizikai-kémiai és biológia-ökotoxikológiai módszeregyüttes alkalmazása szükséges.

Szennyezett területek esetén az ökotoxikológiai eredmények magukba foglalják több szennyezőanyag hatását és azoknak a kölcsönhatásoknak az eredményét, amelyek a szennyezőanyag és a környezeti elem anyagi (matrix) között, vagy több szennyezőanyagnak, valamint a szennyezőanyag és a biota érintett tagjának valamely molekuláris szintű receptora között jöhet létre.

A szennyezőanyag és a mátrix közötti kölcsönhatás szabja meg a szennyezőanyag mobilitását, megoszlását a környezeti elem egyes fázisai között és biológiai hozzáférhetőségét.

A vegyi anyagok egymással történő kölcsönhatásai szinergizmust vagy antagónizmust okozhatnak, melynek eredményeképpen két vagy több vegyi anyag erősítheti vagy gyengítheti, esetleg kiolthatja egymás hatását.

A szennyezőanyag és a biota közötti kölcsönhatás eredménye a biotranszformáció, a biodegradáció és a bioakkumuláció.

A veszélyeztetett vagy szennyezett környezet vizsgálatára alkalmazott integrált vizsgálati módszer fizikai-kémia és biológiai-ökotoxikológiai eredményeket foglal magába. A szennyezett területek állapotfelmérésére, monitoringjára vagy a remediáció követésére és utómonitoringjára alkalmazott integrált módszeregyüttes olyan összetett információt ad a szennyezett terület vagy környezeti elem állapotáról, amely közvetlenül kapcsolatba hozható a szennyezett terület környezeti kockázatával.

A fizikai-kémiai (**K**) és a biológiai-ökotoxikológiai (**B**) eredmények az alábbi összefüggésben lehetnek egymással:

- **K = B**, a kémiai és biológiai eredmények összefüggenek.
- Ha mindkettő kicsi értéket ad, vagyis kis koncentrációt mértünk és a talajminta nem mutatott toxikus hatás sem, akkor a szennyezett terület környezeti kockázata kicsi
- Ha mindkettő nagy értéket ad, vagyis nagy koncentrációt mértünk és egyúttal erős toxicitást, akkor a szennyezett terület környezeti kockázata nagy.
- **K > B**, a kémiai módszerrel mért koncentráció nagy, de a toxikus hatás kicsi. Ez jelentheti azt, hogy a vegyi anyagnak nincs káros hatása, így kevésbé kockázatos, vagy azt, hogy a biológiai rendszerek számára nem hozzáférhető. Ennek oka lehet, hogy a szennyezőanyag más szennyezőanyagokkal vagy a talaj alkotórészeivel olyan kölcsönhatásba lép, mely akadályozza hatásának kifejtését. A **K > B**, a kockázat megítélése és a remediációs technológia kiválasztása szempontjából fontos eset, hiszen a hatás limitáltsága a körülményektől függ. Ez a kémiai időzített bomba. Ilyen esetekben pontosan ismernünk kell azokat a mechanizmusokat, amelyek a hozzáférhetőséget befolyásolják és azok kontrolljára mind a technológia alkalmazása, mind az utómonitoring, mind pedig a terület jövőbeni használat során ügyelnünk kell.

- **K < B** eset azt a helyzetet tükrözi, ami nagyon általános a régi szennyezett területek felmérésekor, hogy a kémiai-analitikai programba nem vettük fel az összes biológiai hatással rendelkező vegyi anyagot. Ez azért is gyakori, mert ha még ismerjük is a terület történetét, az ott tárolt, használt vagy kibocsátott vegyi anyagokat (ez is ritkaság), de az illegális lerakás és a természetes folyamatok beindultával keletkező metabolitok általában nem vehetőek be az analitikai programba. Az ökotoxikológiai vizsgálatok eredménye ilyenkor az indikátor a figyelmeztető. Számottevő mért toxicitás esetén a hatást okozó vegyi anyag azonosításának meg kell történnie és az állapotfelmérést teljessé tenni.

2.6. Környezetirányítási döntések ökotoxikológiai eredmények alapján

Egyre több irányelv és javaslat születik szerte a világon a környezeti kockázat ökotoxikológiai eredményeken alapuló felméréséről és ennek alapján történő döntéshozatalról.

A gyakorlati környezetvédelemben szinte mindig vegyes szennyeződéssel van dolgunk, akár szennyvízről, akár talajról vagy üledékről legyen szó. Régről öröklött területek esetében még nehezebb a helyzet az átalakulások, a transzportfolyamatok és kölcsönhatások térben és időben heterogén lejátszódása miatt. Ennek ellenére a legtöbb ismeretlen szennyezőt tartalmazó hulladék, talaj vagy más környezeti elem esetében még mindig a kémiai megközelítést alkalmazzák, mellyel nem juthatnak sokkal közelebb a kockázat jellemzéséhez, hiszen a PEC oldal is csak részben (az ismert és vizsgált szennyező komponensek esetében) pontosítható, a PNEC pontosítását viszont továbbra is az adatbázisok hiányosságai fogják limitálni.

A probléma egy huszárvágással megoldható lenne, ha a vegyes szennyeződést tartalmazó teljes környezeti mintát, talajt, szennyvizet, iszapot, stb. **ökotoxikológiai tesztelésnek** vetnék alá és a tiszta vegyületeknél alkalmazott pl. faktoriális rendszerhez hasonló értékelési módszerrel becsülnék az ökoszisztémára még nem ható koncentrációt. Tulajdonképpen nem is koncentráció érték lenne ez az érték, hanem vagy a szennyezett környezeti elem hígítással kapott mennyisége, vagy valamiféle toxicitási egység.

Közvetlen ökotoxikológiai tesztelésén alapuló minősítési módszer született szennyvizekre, amit a 6. Táblázat mutat (Kristensen, 1995). A tiszta vegyi anyagok PNEC értékének faktorokkal történő meghatározáshoz hasonló rendszert alkalmaztak, de más faktorokkal.

A vegyi anyagok akut illetve krónikus teszteléséhez használt faktorokhoz képes kisebb faktorokat tapasztalati alapon határozták meg. Összehasonlításképpen ld. a 2. táblázatban az EU TGD (1996) által tiszta vegyi anyagokra javasolt faktoriális rendszert.

7. táblázat: A PNEC érték becsléséhez javasolt biztonsági faktorok vegyes szennyeződést tartalmazó szennyvíziszapok esetében

Rendelkezésre álló információ	Biztonsági faktor PNEC akut	Biztonsági faktor PNEC krónikus
A legalacsonyabb mért LC ₅₀ érték (akut toxicitás)	100	200
Legalacsonyabb akut toxicitás 3 trófikus szint élőlényeivel (LC ₅₀ : hal, alga, <i>Daphnia</i>)	10	20
Legalacsonyabb akut toxicitás érték legalább 5 élőlénycsoporttal mérve	5	10
Legalacsonyabb hosszú távú NOEC mérés három trófikus szinten mérve (pl. hal, <i>Daphnia</i> , alga)	-	5

Módszertani javaslatokat ismertetünk vázlatosan, melyekből kitűnik a biológiai-ökotoxikológiai tesztelés fontossága szennyezett területek talajának megítélésékor.

Torstensson szerkesztésében jelent meg 1994-ben a svéd **MATS** (Mark Test System), mely a talaj biológiai mutatóinak mérését és a kapott eredmények felhasználását tartalmazza, környezeti kockázat felméréséhez. Elsősorban a kezdeti veszély becslésére alkalmas módszeregyüttest tartalmaz az összefoglaló. A vizsgálatokat javasolja alkalmazni:

- peszticidek forgalmazás előtti kipróbálására,
- helyi, lokális szennyeződések felmérésére és
- nagy területeket érintő levegőből eredő szennyezés felmérésére.

Az alábbi vizsgálat típusokat javasolja, ezek metodikáját is megadja.

- Mezőgazdasági vegyszerek kioldódása, mobilitása talajban.
- Szerves vegyületek degradációjának kinetikájának vizsgálata talajban.
- Standard légzési teszt.
- Ammónium oxidációja: gyorsteszt talaj nitrifikáló képességének mérésére.
- Ammónium oxidációja: gyorsteszt a szennyezőanyag hatásának mérésére.
- Denitrifikáció mértékének meghatározása.
- Denitrifikáció: a szennyező hatására bekövetkező változás.
- Heterotróf nitrogénkötés mértéke a talajban.
- Heterotróf nitrogénkötés megváltozása szennyezőanyag hatására.
- Heterotróf nitrogénkötés: nehézfémek hatásának tesztelésére.
- Nitrogénkötés mértéke cyanobaktériumok hatására.
- Cyanobaktériumok nitrogénkötésének megváltozása szennyező hatására.
- Cyanobaktériumok nitrogénkötésének megváltozása nehézfémek hatására.
- Foszfátáz aktivitás becslése a talajban.
- Talaj állati fajeloszlása.

- Talaj légzési görbéjének felvétele a talaj aktivitásának és életképességének jellemzésére.
- Talaj légzési görbéjének megváltozása vegyi anyagok hatására.

Torslov és munkatársai (1997) a dán Water Quality Institutban szennyvíziszapok és más hulladékok talajon való elhelyezésének kockázatára az alábbi biológiai vizsgálatok alkalmazását javasolják a kémiai analízisek (PAH, PCB, klórbenzolok, fenolok, ftalátok és adipátok, foszfortioészterek, illó szerves vegyületek, halogénezett AOX és EOX vegyületek, lineáris alkilbenzolok, fémek, talaj bázisparaméterei) mellé, a mintaelőkészítés és mérés komplett metodikai leírásával:

- nitrifikáció gátlása,
- *Collembola* akut letalitási teszt,
- növényi magvak csírázásának gátlása,
- *Vibrio fischeri* lumineszcencia-gátlási teszt.

A **DECHEMA** Bizottság (1995) által kiadott jelentés a talaj állapotának felmérésére komplex módszertant javasol, amely a talaj szennyezettségét két lépésben vizsgálja és az eredménytől függően tesz javaslatot a talaj felhasználhatóságára. Ezt az eljárást elsősorban ex situ kezelésen átesett talajok további felhasználására, hasznosítására ajánlják.

1. szint: a talaj szennyezőanyag visszatartásának vizsgálata

Avisszatartás megítélése a talaj vizes kivonatának tesztelése alapján történik:

- lumineszcens baktérium teszt,
 - algateszt,
 - *Daphnia* teszt.
- Ha a talaj szennyezett szennyezettségétől függő talajkezelési módszer alkalmazása szükséges.
- Ha a talaj nem szennyezett, akkor a 2. szint vizsgálatai következnek.

2. szint: a talajnak mint élőhelynek a vizsgálata

A tesztek direkt érintkezést biztosítanak a talaj és a tesztorganizmus között:

- magasabb rendű növényekkel végzett teszt,
 - talajnitrifikációs teszt,
 - talajlégzési teszt,
 - földigiliszta teszt.
- Ha **szennyezett** a talaj, akkor a szennyezettségétől függő talajkezelési módszer alkalmazása szükséges.
- Ha **nem szennyezett**, akkor korlátozás nélkül, bármilyen célra felhasználható

Fenti ökotoxikológiai megalapozott eljárás a gyakorlati szempontból rendkívül fontos és jó, ugyanakkor költséghatékony megoldás. Néhány ökotoxikológiai teszt eredménye alapján bátran dönthetünk, nem kell félnünk, hogy analitikai programunkkal meg sem találtuk a valóban veszélyes szennyezőanyagokat. Ilyen és ehhez hasonló megoldások kifejlesztéséhez a tudás bátorságára van szükség az analitikai műszerek soktizedes pontosságú eredményei helyett. A tudás biztonságára alapuló, egyszerű és olcsó döntéstámogató módszerekre lenne szüksége a környezetvédelemnek, a környezetirányítási rendszereknek. Műszerigényes és költséges elemzést csak a felmerült gyanú boznytására érdemes alkalmazni.

A DECHEMA Bizottság a már szabványosított módszereken túl, talajra specifikus új módszereket is javasol, így a talajvíz vizsgálatára alkalmas *Nematoda* tesztet, vagy a mutagén hatások vizsgálatára kidolgozott Ames-, SOS-chromo- és umuteszteket. A talajnak mint élőhelynek a vizsgálatára *Bacillus cereus* tesztet (Rönnpagel, 1995), növényi sejt kultúra tesztet, valamint a csírázás- és gyökérnövekedés gátlás mérésére alkalmas módszereket is javasol.

Gruiz és munkatársai több javaslatot dolgoztak ki olyan módszeregyüttesekre, amelyeket a környezeti kockázatfelmérésére és a talajremediáció tervezése, monitoringja és utómonitoringja céljára lehet alkalmazni. A módszerek kidolgozásán kívül az eredmények értékelésére és interpretálására is tettek javaslatokat (Gruiz et al., 1998a). Módszertani fejlesztéseikben különösen figyelmet szenteltek a szennyezőanyag hozzáférhetőségének, valamint a talaj és a tesztorganizmus kölcsönhatásának vizsgálatára. Az aktuális toxicitás megállapításakor figyelembe kell venni a tesztorganizmus és a környezeti minta, valamint a tesztorganizmus szennyezőanyag kölcsönhatásokat, amelyet a direkt érintkeztetési tesztekkel érhetünk el (Gruiz, 1994).

A toxicitást valamint környezeti kockázatot a szennyezőanyagok illetve keverékek fizikai és kémiai tulajdonságai, mozgékonyasága, hozzáférhetősége valamint biodegradálhatósága határozza meg. A fizikai-kémiai analitikai eredmények kiegészítve az ökotoxikológiai adatokkal biztosítják, hogy a helyspecifikus kockázatfelmérés során számszerű eredménnyel jellemezzük a kockázatot, amely megkönnyíti a döntéshozók munkáját, a prioritások meghatározását, valamint a kockázat kezelését.

A szennyezőanyagok mozgékonyaságát illetve hozzáférhetőségét az őt befogadó környezeti elem tulajdonságai is befolyásolják. Az ökotoxikológiai tesztekkel nyert eredmény a tesztorganizmus érzékenysége túl függ a tesztorganizmus-talajszemcse, tesztorganizmus-szennyezőanyag kölcsönhatásoktól is. A szennyezőanyag terjedése és hozzáférhetősége követhető a fiziko-kémiai analitikai eredményeknek és a biológia-ökotoxikológiai eredmények az összevetésével. A szilárd fázisú (talaj, üledék) környezeti minták adszorpciós kapacitása illetve a szennyezőanyag megoszlási hányadosa határozza meg az elszívargást, a deszorpciót és az illékonyságot. A talaj három fázisa (szilárd, víz, gáz) közötti megoszlás környezeti kockázatot jelent a talajvízre illetve levegőre nézve. Üledékek esetén a pórsvíz és a szilárd fázis közötti megoszlás határozza meg a víz minőségét. Ha az erősen kötődő szennyezőanyag rosszul biodegradálódik, akkor a tartós környezetszennyezés hatására a környezeti elem telíthető, és kémiai időzített bomba alakulhat ki.

Talajok és üledékek környezeti kockázatának megítélésére, a szennyező környezetben történő viselkedésének, sorsának vizsgálatára, előrejelzésére, vagy követésére egy sor új biológiai vizsgálati módszert és ökotoxikológiai tesztet javasoltak és dolgoztak ki. A tesztek egy részének leírása a könyv második részében megtalálható.

- Kontakt tesztek baktériumokkal szilárd fázisú környezeti mintákra.
- Kontakt tesztek növényekkel szilárd fázisú környezeti mintákra.
- Kontakt tesztek talajlakó állatokkal: *Collembola*, földigiliszta.
- Talaj mikrokozmosz: egészséges talaj saját ökoszisztémájára gyakorolt hatás vizsgálata.
- Talaj mikrokozmosz: egészséges talaj eredő enzimaktivitásaira gyakorolt hatás, légzés, dehidrogenáz aktivitás, nitrifikálás, cellulázenzim aktivitás.
- Talaj összsejtszáma, ATP tartalma, CO₂ termelése.
- Talajban folyó biodegradáció.
- Talajban folyó szennyezőanyag mobilizálódás és immobilizálódás.
- Talajban folyó bioakkumuláció.

3. Szennyezett talajok ökotoxikológiai jellemzése

3.1. Általános áttekintés

Az emberi tevékenység által kiváltott stresszek a víz és a levegő mellett a talajt is érintik. A talaj három fázisból álló (levegő, víz, szilárd) szerves és szervetlen anyagokból felépülő bonyolult rendszer, melynek kiemelkedően fontos globális szerepe van az elemek körforgásában, valamint a szárazföldi ökoszisztémák tápanyagellátásában. A talajalkotók az ökoszisztéma normális működéséhez szükséges tápanyagokhoz hasonlóan a szennyezőanyagok megkötésére is képesek, aminek hatására a talaj minősége, ökológiai struktúrája (fajösszetétel, fajsűrűség, fajeloszlás) és ebből adódóan biológiai aktivitására jellemző mennyiségi mutatók (sejtszám, légzés, nitrifikálás, totál enzimaktivitások, tápanyagok immobilizálása és mobilizálása, elemek körforgása) megváltozhat.

A talajok biológiai és ökotoxikológiai jellemzése a környezettudományok legtöbb területén egyre nagyobb jelentőséget kap. Különös fontosságúak a tudományos ismeretek azon szintjén, melyek közvetlenül a környezetpolitikuskok és irányítók döntéseit hivatottak támogatni. Kiemelhető ezek közül a **vegyi anyagok általános kockázatának és a szennyezőanyagok helyspecifikus kockázatának felmérése**hez szükséges ökotoxikológiai adatok szolgáltatása. Az egyszeri ökotoxikológiai teszteredményt igénylő kockázatfelmérési módszerekhez képest pontosabb eredményhez vezet a **monitoring adatok alapján történő ökológiai- és egészségkockázat felmérés**. Egyre sürgetőbb a **hatáson alapuló határértékrendszerek kidolgozása is**, a fejlett nyugat-európai és amerikai államokban kiterjedt kutatás folyik a hatásokon alapuló határértékképzés módszerének kidolgozására és a megfelelő végpontok megtalálására (NOAEC, LOEC, MATC, stb.). Tudósok olyan ökotoxikológiai eredményeken alapuló minősítő- és kritériumrendszer kidolgozásával is foglalkoznak, ahol a határérték nem egy koncentráció, hanem magának a biológiai-ökotoxikológiai módszeregyüttesnek az eredménye, a szennyezett környezeti elem dóziséra vonatkoztatva, pl. LD₅₀, előre megadott tesztek esetében.

Talaj esetében a kockázatcsökkentés módjának kiválasztásával, az intézkedésekkel, a remediáció szükségességének eldöntésével és a remediációs technológia kiválasztásával kapcsolatos döntéseket egyértelműen támogatják a biológiai és ökotoxikológiai módszerek eredményei, gondoljunk a biodegradálhatóságra. A remediációs technológia tervezésében is alapvető szerepük van, pl. a biológiai bontás intenzifikálási lehetőségeinek vizsgálatakor. A talajkezelési technológia környezeti hatásának, kockázatának felmérésében és jellemzésében, a technológia követésében, pl. ismeretlen toxikus melléktermékek vagy maradékok kimutatásában, egyre növekszik a biológiai és ökotoxikológiai talajtesztelési módszerek jelentősége.

Ennek ellenére a talajvédelem célja ez idáig nem a talajökoszisztéma megóvása, hanem a talajhasználattal összefüggő funkcióinak, illetve az ivóvízbázisok tisztasá-

gának megőrzése volt. Ezért a talaj fizikai-kémiai tulajdonságainak vizsgálatán volt a hangsúly, míg a talajra kerülő szennyezőanyag ökoszisztémára gyakorolt káros (ökotoxikus) hatását nem tanulmányozták. A talajnak a szennyezőanyagok káros hatásának kompenzálására óriási pufferkapacitása van, ami a háttérben alattomosan működő káros változásokat és hatásokat a talajfunkció viszonylagos érintetlensége miatt elmaszkírozza. Ezért nagyon fontos, hogy a talajok esetében a kémiai és biológiai vizsgálati eredményeket mindig párhuzamosan végezzük, és együtt értékeljük.

A nem szennyezett, ép talaj ökoszisztémáját sem ismerjük tökéletesen, nehezen tudjuk megkülönböztetni a klimatikus és szezonális változásokat a vegyi anyagok károsnak minősülő hatásaitól, nem beszélve a trendekről, melyek hosszabb időn keresztül folyó monitoring hiányában nem ismertek, vagy ha ismertek is nehezen értékelhetőek, reverzibilis vagy irreverzibilis voltak nem megítélhető. Tovább bonyolítja a helyzetet az adaptáció kérdése, az, hogy a talaj mikroflórája és a növények egy része is képes hozzászokni, tűrni vagy ellenállni a káros hatásoknak. Külön említést érdemel a talaj mikroflórája, mely határtalan adaptációs képességgel, flexibilitással és biodegradációs kapacitással jellemezhető. Éppen ezért a mikroflóra vizsgálata nem mindig ad felvilágosítást a talaj szennyezettségi állapotára, főleg nem a mikroflóra mennyiségi jellemzése. A talajok ökoszisztémájának, biológiai állapotának minőségi jellemzése sokféle lehet, a fajeloszlástól a különböző metabolikus aktivitásokon (légzés, nitrifikálás) keresztül a genetikai vizsgálatokig (rezisztenciáért felelős gének, vagy biodegradációért felelős plazmidok kimutatása), de az ökoszisztéma rutinszerű minősítésére ezek ma még nem használatosak, nincsenek egységesített módszerek. Néhány esetben sikeresen használják, pl. termőhely tipizálás céljára, a talaj potenciális és tényleges biológiai aktivitásának, konkrét enzimaktivitásoknak, a mineralizáció mértékének meghatározására, vagy biomassza becslésre. Szennyezett talajok esetében, egy időpontban végzett állapotfelmérés igen félrevezető eredményeket adhat, ha nem vesszük figyelembe a szennyeződés korát és az időbeni változás lehetőségeit.

A kémiai analitikai módszerek a talajban található szennyezőanyagok feltárás után mérhető koncentrációját határozzák meg, nem a biológiai hozzáférhetőségtől függő aktuális toxicitást, vagy más káros hatást, amely függ a szennyezőanyagok kémiai formájától (vegyülettípus, oxidációs fok), és a talaj jellemzőitől (szervesanyag- és agyagtartalom, pH, redox viszonyok). Figyelembe kell venni az esetleg jelenlévő egyéb anyagokat is, mivel azok a legkülönbözőbb kölcsönhatásokba (antagonista, additív, szinergikus) kerülhetnek a vizsgált szennyezőanyaggal. A talajban bizonyos típusú vegyületek biodegradáción mennek keresztül, amelynek hatására kémiai analitikával nem vizsgált, de esetleg hatványozottan toxikus anyagok keletkeznek. A felsorolt okok hangsúlyozni kívánták a **biológiai és ökotoxikológiai módszerek szükségességét** a szennyezett talajok környezeti vizsgálatában.

A környezet állapotának vizsgálatakor, mind a kémiai analitikai, mind az ökotoxikológiai módszerek alkalmazása esetén igen fontos **a talajminta előkészítése**. A szakirodalom számos, szennyezőanyag típusra specifikus extrahálószerrel említ, azonban a környezeti realizmus szempontjából e szerek használata általában nem

releváns. A biológiai szabvány módszerek sok esetben 10x-es mennyiségű vízzel nyert kivonatot vizsgálnak. Az ilyen jellegű kinyerés azonban a szennyezőanyagok nagymértékű hígulását eredményezi, így a kivonat gyakran nem alkalmas a talajtoxicitás megállapítására. A vizes kivonat nem modellezi helyesen a szennyezőanyagok terjedését, megoszlását a talaj és a pórusvíz között, a biológiai felvehetőséget sem, de a kioldódás, a szennyezőanyagok csapadék hatására történő bemosódása mélyebb rétegekbe és a vízfázisba (talajvíz) kerülő mennyisége megbecsülhető a vizes kivonatból nyert eredmények alapján. A vizes kivonatok készítésénél általában az egyensúlyi viszonyok beállása után mérnek, és a reprodukálhatóság miatt törek-szenek is az egyensúlyok beállítására. A természetben lejátszódó folyamatok sosem egyensúlyiak. Tehát ebből az eredményből a szennyezőanyag bemosódásának pontos folyamata csak az áramlási viszonyok, a vegyi anyag és a környezeti közeg tulajdonságai ismerete alapján létrehozott dinamikus és nem egyensúlyi modell alapján lehetne teljesen helytálló eredményre jutni.

A **biológiai hozzáférhetőségtől** függő aktuális toxicitás jellemzésére a teljes talaj direkt vizsgálata alkalmas, amelyet az irodalom interaktív (Gruiz, 1998 b) vagy kontakt módszerként említ, néha a teljes talaj (whole soil test) megkülönböztetést is használnak. Az interaktív tesztek figyelembe veszik a szennyezőanyag–talajszemcse, testtổrganizmus–talajszemcse (biofilm), testtổrganizmus–talajszemcse–szennyezőanyag kapcsolatokat (Gruiz, 1994 és 1998 a,b).

A szennyezett talaj jellemzésére használt biológiai módszereket többféleképpen csoportosíthatjuk. Általános értelemben megkülönböztethetünk **ökotoxikológiai, biodegradációs és bioakkumulációs** tesztek, amelyek bármelyike szolgálhat **bioszenzor** előállítás alapjául is. Talajokra alkalmazható ökotoxikológiai tesztek széles skálán mozognak. A szennyezettség meglétének és hatásának vizsgálatát alapvetően három **módon** végezhetjük:

- a veszélyeztetett vagy szennyezett talaj saját ökoszisztémájára, vagy annak egyes tagjaira gyakorolt hatás vizsgálatával, és
- a vizsgált talajtól független talajlakó organizmusokra, pl. laboratóriumi testtổrganizmusra, vagy
- tiszta, referencialaj mikroflórájára, annak aktivitásaira gyakorolt hatáson keresztül.

3.1.1. A talaj ökotoxikológiai tesztelésére alkalmas megoldások

A tesztek céljától függ azok kivitelezési módja. Az alábbiakban néhány, talajoknál gyakori ökotoxikológiai vizsgálatípust sorolunk fel.

- Saját mikroflóra, flóra és fauna mennyiségi és minőségi vizsgálata:
 - biomonitoring,
 - fajeloszlás,
 - biomarkerek,
 - bioindikáció.

- Saját mikroflóra aktivitása a teljes talajból mérve:
 - légzés,
 - energiatermelés,
 - nitrifikálás,
 - enzimaktivitások: dehidrogenáz, nitrifikáció, denitrifikáció, nitrogénkötés, celluláz, stb.
- A teljes talaj és/vagy a pórusvíz hatásának mérése:
 - laboratóriumi tesztorganizmusokra: ökotoxikológiai tesz, bioteszt, bioassay
 - modellrendszerben, kontrollált ökoszisztémára: mikrokozmosz és mezokozmosz
 - az ökoszisztémába kihelyezett kontrollált tesztorganizmusra: aktív biomonitoring.

Az ökotoxikológiai módszerek, amint azt az eddigiekből is láhattuk, megkülönböztethetők a **kivitelezés helyétől** függően is, így lehetnek laboratóriumi módszerek vagy szabadföldiek. Időigény, reprodukálhatóság, gazdaságosság szempontjából a laboratóriumi tesztek előnyt élveznek, azonban környezeti realizmusuk kedvezőtlenebb, mint a mikrokozmosz, a mezokozmosz vagy a szabadföldi vizsgálatoké. Ez utóbbiaknál viszont olyan előre nem látható faktorok, mint a klímaváltozás vagy egy vírusfertőzés módosíthatják a biológiai választ. A mezokozmosz a szabadban létrehozott mesterséges ökoszisztéma (pl. mesterséges kert, mesterséges erdő), míg a mikrokozmosz laboratóriumban összeállított, a természetes ökoszisztémát modellező rendszer (pl. biodegradációs vagy légzési teszt talajjal töltött reaktorokban). A mikro- és mezokozmosz egyed feletti szinten mérik a komplex hatásokat, nagyszámú, egymással kölcsönhatásban álló faj populációit vizsgálva egyidejűleg. A biológiai jellemzők mellett a fizikai-kémiai vizsgálatok széles köre is alkalmazható, hosszabb időn keresztül is követhető a mikrokozmoszban vagy mezokozmoszban folyó evolúció, fajeloszlás változás, stb. a vizsgálandó vegyi anyagok hatására.

3.1.1.1. Szennyezett talaj ökotoxikológiai eredményének felhasználása

Az ökotoxikológiai vizsgálatok alkalmazása feltétlenül szükséges szennyezett területek **környezeti állapotfelmérésben**. Az egyszerűbb laboratóriumi tesztek segítségével lehetségessé válik nagyszámú minta közül a toxikusak kiválasztása (Gruiz, 1992; Horváth és Gruiz, 1994, 1995, 1996). Ökotoxikológiai tesztek szűrővizsgálatként való alkalmazása különösen előnyös régi, öröklött szennyezett területek és illegális hulladéklerakók esetében, amikor semmit nem tudunk a szennyezőanyag minőségéről, összetételéről és eloszlásáról. Ismert szennyezőanyagokkal szennyezett talajok esetében a biológiai és ökotoxikológiai vizsgálatok eredménye többletinformációt ad a fizikai-kémiai eredményekhez képest, amennyiben figyelembe veszi a kölcsönhatásokat, a biodegradációt és a hozzáférhetőséget. A kölcsönhatások sorában említést érdemelnek a szennyezőanyagok közötti kölcsönhatások (szinergizmus, antagonizmus), a vegyi anyag és a környezet kölcsönhatásai (oxidáció-redukció, hidrolízis, megoszlás, adszorpció-deszorpció, hozzáférhetőség,

stb.) és a szennyezőanyag és a biota közöttiek (biológiai hozzáférhetőség, biotranszformáció, biodegradáció, bioakkumuláció).

A biológiai tesztek **korai figyelmeztetőrendszerként** is működhetnek, melyek a szennyezőanyag jelenlétét és káros hatását még az ökoszisztéma komoly károsodása előtt kimutathatják. Ennek feltétele azonban, hogy a veszélyeztetett területen integrált monitoring rendszer működjön, ismerjük az ökoszisztémát alkotó közösségek tagjait, tudjuk, hogy melyek a legérzékenyebb fajok.

Az ökotoxikológiai tesztek elengedhetetlenek a használatból kizárt, elfektetett, vagy remediálásra váró szennyezett területek megfigyelése, monitoringja esetén is. Monitoringrendszerbe integrálva a környezeti állapot változásait és a természetes remediálási folyamatok lefolyását jellemezhetjük az eredményekkel.

Hasonló a helyzet remediálás alatt álló területek, vagy ex situ remediálásnak alávetett talajok esetében is, ahol a **remediáció időbeni nyomon követése** integrált monitoring rendszerrel oldható meg. A szennyezett területek integrált monitoringja alatt az ökoszisztémát befolyásoló fizikai és kémiai paraméterek mellett, a biológiai változások térben és időben történő nyomon követését értjük. Az integrált technológiamonitring mind *in situ*, mind *ex situ* talajremediációnál alkalmazható, a használható módszerek választéka *in situ* remediáció esetében kiegészül az ***in situ* biomonitoring** módszerek alkalmazási lehetőségével.

A remediációs technológia alkalmazását és befejezését követő **utómonitoring** esetében is elengedhetetlen az integrált szemlélet, vagyis a fizikai-kémiai paraméterek mellett a biológiai és ökotoxikológiai jellemzők mérése.

3.1.1.2. Az ökotoxikológiai módszerek előnyei és hátrányai

Az ökotoxikológiai és biomonitoring módszerek használata a vegyi szennyeződés ellenőrzésekor **számos előnyt jelent**, a kémiai monitoringot kiegészíti, és részben helyettesítheti. A biológiai módszerek ellen szóló érvek - miszerint nehezen standardizálhatók és az adatok értékelése nagy szakértelmet igényel -, ellenére használatuk rohamosan terjed, hiszen többletinformációt szolgáltatnak a szennyezőanyagok ökoszisztémát érintő káros hatásáról, biodegradálhatóságáról, bioakkumulációjáról, valamint a vegyületek kölcsönhatásairól.

A biomonitoring módszerek gyakran olcsóbbak, pontosabbak és érzékenyebbek a környezetben lejátszódó kedvezőtlen feltételek jelzésére, mint a kémiai analízis. Ez abból a tényből adódik, hogy a biológiai válasz integráló természetű, különösen a fejlettebb biológiai szervezetek esetén. Ez a szükséges mérések számának csökkentéséhez vezethet mind térben, mind a mérések gyakoriságában.

A talajok nagyfokú heterogenitása, amely a talaj minden léptékében jellemző, kevésbé vagy egyáltalán nem befolyásolja a talaj ökológiai rendszerét, ökoszisztémájának tagjait, hiszen azoknak meg van a megfelelő helyük a heterogén rendszerben, vagy még jobb úgy fogalmazni, hogy őket szolgálja ez a heterogenitás. A fizikai-kémiai vizsgálatok viszont függenek a talaj heterogenitásaitól, átlagminták átlag-

paramétereit akarjuk meghatározni, amelyek esetenként nem is jelentenek semmit az ökoszisztéma szempontjából, viszont szinte teljesíthetetlen követelmények elé állítják a mintavételt tervező és kivitelező szakembereket.

A hatás mérésének hátránya, hogy csupán a megfigyelt hatásból nehéz vagy lehetetlen a szennyezőanyag jelenlétére következtetni, a biológiai eredményt a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaival összekapcsolni. Tehát a biológiai egymagában nem tudja jól hjellemezni a környezet állapotát. De a fizikai és kémiai mérési eredmények sem elegendők egymagukban. A jelenlegi kémia-orientált szennyeződéscsökkentési irányelvek és kémia-specifikusan megfogalmazott környezeti problémák mellett a biológiai hatás analízise háttérbe szorul, holott a kockázat jellemzése csak a kettő integrált alkalmazásával lehet teljes.

3.1.1.3. A környezeti problémához illeszkedő ökotoxikológiai teszt

Az ökotoxikológiai teszt kiválasztásakor azt kell szem előtt tartanunk, hogy a módszer illeszkedjék a környezeti problémához, a feltett kérdésekre adja meg a választ. Például egy remediációs eljárás esetén a talaj biológiai és ökotoxikológiai jellemzése során használt biológiai változók kiválasztásakor figyelembe kell venni az eljárás jellegét, a környezeti viszonyokat, vagyis azt, hogy a talajremediáció során esetlegesen fellépő káros hatások milyen környezeti elemeket érintenek, valamint a hatékonysági, a gazdasági, a logisztikai és a politikai vonatkozásokat.

A biológiai és ökotoxikológiai talajvizsgálat során használt teszteknek a következő négy **követelményt** kell teljesíteniük:

- reprodukálhatóság,
- érzékenység,
- megbízhatóság,
- környezeti realizmus.

A követelmények közül azonban néhány kölcsönösen kizárja egymást. Általánosan tapasztalt tény, hogy a környezeti realizmus fordítottan arányos az olyan kritériumokkal, mint például az érzékenység és reprodukálhatóság.

A biológiai és ökotoxikológiai tesztek közül számos eljárást találunk nemzetközileg elfogadott irányelvekben és szabványokban. Mivel azonban a különböző környezeti problémák eltérő ökotoxikológiai tesztek igényelnek, a kutatócsoportok világszerte folyamatosan produkálják az új eljárások végtelen sorát.

A talajra kerülő anyagok ökológiai szempontból káros hatásával foglalkozó **ökológiai kockázatelemzés** (Gruiz, 1997) az ökotoxikológiai módszerek eredményére alapoz, amelyekből extrapolálással határozza meg az ökoszisztéma egészére várható kockázat mértékét (Gruiz és mtsai, 1995). A **bioakkumulációs és biomagnifikációs** tesztek szintén a környezeti kockázatelemzés eszközei, a táplálékláncba kerülést és végső soron az embert érintő kockázatot befolyásolják.

A szennyezőanyagok ökológiai és humán egészségkockázatának megítélésakor figyelembe kell venni az illető vegyszer **biodegradációra** való hajlamát, illetve a folyamat során keletkező köztes és végtermékek jellegét. Ezért a kockázatfelmérés módszertanában a biodegradációs tesztek gyakran megtalálhatóak. Az irodalomban vagy adatbázisokban található biodegradálhatóságot jellemző értékek helyspecifikusan nagyságrendekkel eltérhetnek a már többször említett adaptáció miatt.

További rendkívül fontos jellemző a környezeti kockázat megítélése szempontjából a szennyezőanyag **hosszútartóssága**. A hosszútartósság kérdésére a teljes talaj és a különböző kivonatok párhuzamos kémiai analízise és ökotoxikológiai tesztelése adhatja meg a helyes választ (Gruiz, 1999).

A szennyezőanyag környezetben jellemző sorsa (terjedés, megoszlás, biodegradáció, bioakkumuláció) nagyban befolyásolja a szennyezőanyag hatását a biotára. Megváltoztatja annak fajeloszlását, szaporodását, fiziológiai és biokémiai aktivitását. Mindezek eredményeképpen megváltozik a talajban az elemek körforgása, és rezisztencia is kialakulhat. Ezek a folyamatok visszahatnak a környezet állapotára, szennyezettségére, az elsődleges produkcióra. A vázolt, egymásra épülő folyamatok és jellemzők közül a szóban forgó terület vagy talaj esetében adekvát paraméterek helyes kiválasztása után tudjuk meghatározni az állapotfelmérésre, a talaj és a technológia jellemzésére valamint a monitoringra alkalmas fizikai-kémiai, biológiai és ökotoxikológiai módszereket (2. ábra).

3.2. A talajökoszisztéma tagjai és szerepük

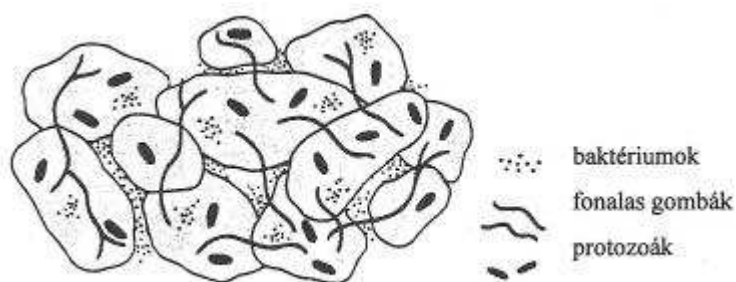
A szárazföldi ökoszisztémák igen összetettek. Az alapvető trofikus szinteken, vagyis a termelőkön (növények), az elsődleges és másodlagos fogyasztókon és a ragadozókon kívül hatalmas szerepe van a detritusznak, annak a talajban élő közösségnek, amely a holt szerves anyagok feldolgozását végzi, annak egy részét mineralizálják, másik részét pedig humusszá alakítják.

A talajba került holt szerves anyagok mineralizációja biztosítja az elemek körforgását a földi ökoszisztémában, azt, hogy a szerves anyagokba beépült, átmenetileg immobilizált elemek ismét szervetlen formába kerüljenek, hogy akár légnemű, akár vízben oldható kisméretű molekulákként a növények és a mikroorganizmusok bioszintézisre fel tudják használni. A talajban élő mikroorganizmusok és apró állatok a holt szerves anyagot saját energiaellátásukra használják, miközben mineralizálják.

A talaj élővilága, elsősorban a detritusz, de a növények is, a természetes holt szerves anyagokkal azonos elbírálásban részesítik a szennyező anyagokat is. Ha egy xenobiotikum molekulája illik anyagcseréjük valamelyik enzimjéhez, elfogadják azt szubsztrátul. Hihetetlen változatosságuk, szinte végtelen genetikai potenciáljuk szinte minden szerves szennyezőanyag bontására képessé teszi őket.

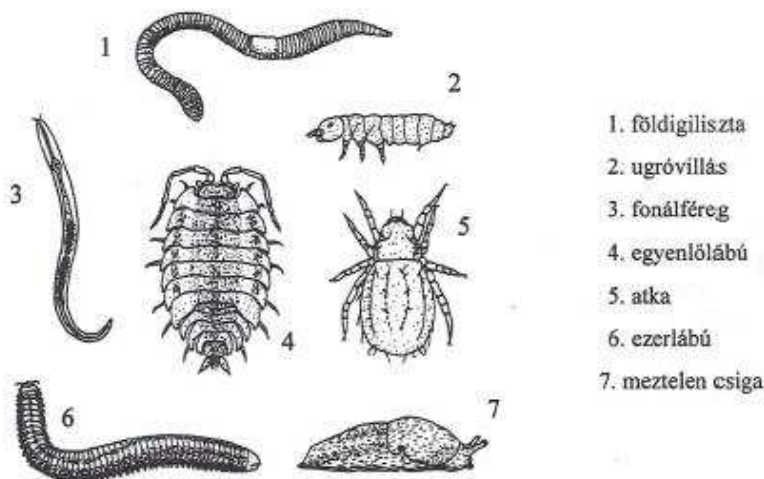
A talajban élő mikroorganizmusok a talaj mikroszemcséinek felületén vagy mikrokapillárisaiban élnek, méretüktől függően. A talaj egy grammjában több mil-

lió, de nem ritkán több milliárd mikroorganizmus él, szorosan kapcsolódva a szilárd felülethez (12. ábra). A talaj vizes fázisában csak elenyésző számú baktérium, gomba és protozoa él. A talajmikrobák között jelentős szerep jut a fonalas baktériumoknak és a fonalas gombáknak, melyek domináns jelenlétét főleg közvetett bizonyítékok alapján állítjuk, hiszen kimutatásuk és sejtkoncentrációjuk megállapítása a technika múltbeli állása szerint lehetetlen volt. A géntechnikák ezen a területen is áttörést jelenhetnek, hiszen hibridizációs próbákkal és a polimeráz láncreakció segítségével mód nyílik ezen mikroorganizmusok izolálás nélküli szelektív és érzékeny kimutatására közvetlenül a talajból.



12. ábra: Mikroorganizmusok a talaj mikroszemcséin (Prescott et al., 1993)

A talajlakó organizmusok mérete 10 nm-től 10 cm-ig terjed. A baktérium fajok közül legnagyobb számban az *Arthrobacterek*, a *Pseudomonasok*, a *Bacillusok* az *Azotobacter* nemzetség tagjai valamint a N-körforgalomban szerepet játszó *Nitrosomonas* és *Nitrobacter* fajok találhatóak.



13. ábra: Ökotoxikológiai tesztelésre is alkalmas talajlakó állatok (Calow, 1993)

Az actinomicéták közül a *Streptomyces*, míg a gombák közül az *Aspergillus*, a *Penicillium*, a *Trichoderma* és a *Cladosporium* fajok fordulnak elő leggyakrabban, de több száz, vagy ezer faj is felsorolhatnánk, mint a talaj mikroflórájának alkotóját. A következő trofikus szinten találhatóak a protozoák (állati egysejtűek), a méshéjúak (*Testacea*), valamint a csillósok (*Ciliates*), amelyek közül a protozoák közé tartozó *Tetrahymena* és a *Colpoda* fajoknak van különös ökotoxikológiai jelentősége. A többsejtű állatok széles körben fordulnak elő a talajban (13. ábra), ezek közül sokat alkalmaznak ökotoxikológiai teszorganizmusként is, például a földigilisztákat (*Lumbricidae*), az ugróvillásokat (*Collembola*), fedelesszárnyúakat (*Coleoptera*), százlábúakat (*Chilopoda*) és ezerlábúakat (*Millipoda*) és a csigákat.

A talajnedvességben és a talajvízben ugyancsak számos egy- és többsejtű organizmust figyelhetünk meg. A baktériumok mellett *Nematodák* (fonálférgék), atkák (*Acarina*), egyenlőlábúak (*Isopoda*), és a felemáslábúak (*Amphipoda*) a legjellemzőbbek. (Danielopol, 1989). A talajban élő organizmusok, mint a talajökoszisztéma tagjai kölcsönösen hatnak egymásra, együttműködnek, anyagcseréjük egymásra épül, fajon belüli és fajok közötti szelekciók, kommenzalizmus, kooperáció, szimbiózis, kompetíció, amenzalizmus, parazitizmus, predáció lehetséges. Szennyezőanyag hatására az ökológiai struktúra megbomlik, az egyensúlyok felbomlanak, irreverzibilis eltolódások jönnek létre, ami a talaj funkcióinak megváltozásához vezet.

A talajökoszisztémán belül három kölcsönhatásnak különösen meghatározó szerep jut. A növények gyökerén élő különböző gombák (rizoszféra: gyökérszóna mikroorganizmusai), melyek elősegítik a víz és a tápanyagok felszívódását, valamint antibakteriális hatással bírnak (Odum és Biever, 1984). A lebontási folyamatokat a talajban a növények mellett a szaprofiták végzik, amelyek szennyezőanyagok hatására csökkent mértékben képesek a CO₂ termelésre valamint a nitrogén mobilizációjára. A harmadik kritikus kapcsolat a ragadozó-zsákmány (predátor-préda) kölcsönhatás. Ökotoxikológiai vizsgálatok bizonyították, hogy számos esetben a predátor érzékenyebb volt növényvédőszerre, mint a prédája. Vagyis szennyezőanyag hatására a préda populáció nagymértékben elszaporodhat megbontva ezzel az ökológiai egyensúlyt. Itt kell említenünk az okok között a bioakkumulációt, illetve annak a tápláléklánc több felmenő tagján végigvonuló igen veszélyes változatát a biomagnifikációt, vagyis a hatványozott bioakkumulációt.

A talaj **ökotoxikológiai tesztelésének** akkor nagy a környezeti realizmusa, ha a fent említett kapcsolatokat figyelembe veszi. Ez gyakorlatilag csak a mikrokozmosz vagy még inkább a mezokozmosz tesztekben valósul meg. A jelenleg szabványosított módszerek azonban csak részben tesznek eleget a fenti követelményeknek. A talajra jellemző ökológiai kölcsönhatások mellett a talajba kerülő szennyezőanyag toxicitásának megítélésekor figyelembe kell venni a talaj tulajdonságait is, amelyek nagyban befolyásolják a biológiai hozzáférhetőséget. A különböző organizmusok a környezetbe kerülő szennyezőanyagokat eltérő módon veszik fel (emésztő-rendszer, belégzés, bőrön keresztül történő felszívódás), ezért a toxicitás vizsgálatakor a minta előkészítésének is fontos szerep jut.

3.3. Talajtesztek módszertani áttekintése

Az **ökotoxikológia fogalmának definiálása** nem könnyű feladat. Általános értelemben az ökotoxikológia a már ismert és az új szennyezőanyagokat, és azok környezetre gyakorolt ökológiai hatását tanulmányozza (Calow, 1993).

Az ökotoxikológiai tesztek figyelembe veszik az ökológia törvényszerűségeit, így egyed szinten az egyed élettani viselkedését (pusztulás, növekedés, energiaháztartás, biokémiai folyamatok, mutáció) vizsgálják, a populáció szintjén pedig a szaporodás, egyedsűrűség, eloszlás törvényszerűségeivel foglalkoznak. Társulás szintjén a fajszám, a fajok közötti kapcsolatok, indikátor fajok jelenléte; míg az ökoszisztéma szintjén a rendszer egészének anyag- és energiaforgalma áll az ökotoxikológia érdeklődésének középpontjában (Suter, 1989).

A leírtak egyenes következménye, hogy az ökotoxikológia eszköztára széles és a vizsgálatok tárgyától függően rendkívül változatos.

3.3.1. Egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek

A szennyezőanyagok ökotoxikus hatását vizsgálhatjuk **egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztekkel**, amelyek többsége laboratóriumi körülmények között könnyen elvégezhető; gyakran műszert sem igényel, így kivitelezési költsége alacsony. Hátrányuk, hogy viszonylag kicsi a környezeti realizmusuk, mivel természetes viszonyok között nem pusztán egy faj egyedei kerülnek kapcsolatba a szennyezőanyaggal, hanem különböző fajok populációi. Így a szennyezőanyagok természetes viszonyok között fellépő hatásának megállapítására az egy fajt alkalmazó tesztek félrevezető választ adhatnak (Van Capelleveen, 1995). Lényegében tehát az extrapolálás egy fajról, - a tesztorganizmusról -, egy másik fajra vagy az ökoszisztéma egészére csak nagy körültekintéssel végezhető el (Cairns és Pratt, 1989). Az egy fajt alkalmazó tesztek közül a mikrobiális módszerek tűnnek a legalkalmasabbaknak az ökoszisztéma jellemzésére, mivel majdnem minden ökoszisztémában megtalálhatók, így a jól választott tesztorganizmus reprezentálhatja a környezeti viszonyokat (Calow, 1993).

Az egy fajt alkalmazó talaj ökotoxikológiai tesztek végpontja széles skálán mozoghat. A leggyakrabban használt végpont a tesztorganizmus **túlélése vagy pusztulása**. Ökológiai szempontból azonban a szubletális reakciók, mint a **növekedésgátlás** vagy a **szaporodás** tanulmányozása kedvezőbb, mint a túlélése. Mayer és munkatársai (1986) szerint viszont a szubletális végpontok jól korrelálnak (0,95-0,97) a túléléssel, így a túlélés is alkalmazható végpontjelzésként.

Sok esetben a tesztorganizmus **biokémiai, fiziológiai** változása használható a szennyezőanyag kimutatására. Végpontként igen gyakran alkalmaznak különböző **enzimek aktivitásának változását** (ATPáz, dehidrogenáz, foszfátáz, észteráz, luciferáz). Torslov (1993) *Pseudomonas fluorescens* tesztorganizmus esetén összehasonlította különböző szennyezőanyagoknak a növekedésre, a dehidrogenáz és a

foszfátáz enzimaktivitásra gyakorolt hatását. A végpontok nem bizonyultak az összes szennyezőanyagra azonos érzékenységűnek, amiből arra következtettek a szerzők, hogy különböző szennyeződések esetén nem csupán a tesztorganizmust, de a tesztelési végpontot is körültekintően, optimálás útján kell megválasztani.

Sokszor különböző anyagcsere-termékeknek illetve valamely enzim szubsztrátjának koncentrációját használják a toxicitás vizsgálatára. A legismertebb rendszer, az ATP-TOX az ATP-szintet méri szentjánosbogár luciferáz enzimje és D-luciferin kofaktor jelenlétében luminométerrel (Xu és Dutka, 1987).

A biokémiai vizsgálatok közé tartoznak a respirációs és a mikrokalorimetriás tesztek. A respirációs tesztek a környezeti minta saját mikroflórájának vagy a tesztorganizmusnak a légzését tanulmányozzák (pl. BOI_5 teszt víznél vagy a talajlégzés talajnál). A mikrokalorimetria a szennyezőanyag hatására bekövetkező hőmérséklet-fluxus változását méri (Calow, 1993).

A *Spirillum volutans* bakteriális **mozgásképpességi tesztet** Dutka írta le először (Calow, 1993). A módszer elve, hogy szennyezőanyag hatására a tesztorganizmus mozgásképpessége csökken vagy megszűnik, mivel a kemotaxis mechanizmusáért felelős CheA, CheB, CheY, CheZ, CheR enzimek valamelyike gátolt.

A géntoxikológiai tesztek (Ames-teszt, SOS chromotest, Mutatox-teszt) a szennyezőanyagok mutagén hatását vizsgálják. Ezekben az esetekben a bioteszt végpontja a **mutáció**.

Az **Ames-tesztet**, a *Salmonella* mutagenitási tesztet kifejlesztőjéről nevezték el. A módszer hisztidin auxotróf *Salmonella typhimurium* törzset használ, amely mutagén hatásra elveszti auxotróf jellegét, vagyis hisztidint nem tartalmazó táptalajon is képes növekedni.

Az **SOS chromotest** alapja, hogy mutáció hatására az SOS javító mechanizmus aktiválódik. Mivel a tesztorganizmusban az SOS operon egy β -galaktozidáz operonnal összeépítve található, az SOS javítás folyamataiért felelős enzimek szintézise együtt jár a β -galaktozidáz transzlációjával. A β -galaktozidázhoz megfelelő szubsztrátot adva színes terméket kapnak, amely kolorimetriásan meghatározható (Xu és munkatársai, 1987).

A **Mutatox-teszt** *Photobacterium phosphoreum* sötét mutánsát használja, amely mutagén hatásra visszanyeri lumineszkáló képességét. A lumineszcencia luminométerrel detektálható (Kwan és Dutka, 1990).

A fent említett tesztekhez emlős máj lecentrifugált frakcióját (9000 g), az S9-et adagolva modellezni lehet az emlősökben, illetve a halakban lezajló enzimatis reakciókat, így a bakteriális géntoxikológiai tesztekkel következtethetünk a szennyezőanyagok magasabb rendű szervezetekre gyakorolt hatására.

Géntoxikológiai tesztek (Ames, SOS Chromotest, Mutatox) összehasonlító vizsgálatát végezték el Legault és munkatársai (1994) és az Ames-tesztet találták a legérzékenyebbnek az általuk vizsgált mutagén anyagokra.

3.3.2. Akut és krónikus tesztek

Az egy fajt alkalmazó tesztek között nagy számban találhatóak rövid ideig tartó teszteljárások, így az általuk nyert válasz a szennyezőanyag **akut toxikus** hatására utal, ezek kevésbé képesek a hosszú távú hatások jelzésére. Pedig az esetek 88%-ában, ha a szennyezőanyag rendelkezik akut toxicitással, akkor krónikus hatása is kimutatható. (Sloff és Canton, 1983)

A tesztelésre használt organizmus kiválasztását körültekintően kell végezni, hogy a kapott eredmény alapján következtetéseket vonhassunk le a magasabb trofikus szinten élőkre. A különböző tesztorganizmusok érzékenysége egy adott szennyezőanyagra nagy változatosságot mutat. Ha kockázatfelmérésre akarjuk használni az eredményt és pesszimista becslést alkalmazunk, célszerű a szennyezőanyagra legérzékenyebb fajt választani a tesztelésre (Giesy és Graney, 1989). Természetesen ezen elv megvalósíthatósága csekély, hiszen az ökotoxikológiai tesztelést erősen bonyolítaná az esetről esetre történő tesztorganizmus választás. Ezért biotesztelésre olyan tesztorganizmust célszerű használni, amelynek már ismerjük az érzékenységét különböző szennyezőanyagokra (laboratóriumi tesztek).

Az egy fajt alkalmazó tesztek többnyire egyszerű laboratóriumi vizsgálatok, így az abiotikus viszonyokat (hőmérséklet, páratartalom, minta állaga) csak kevésbé veszik figyelembe. A szennyezőanyagokat a természetes viszonyaiból kiemelve vagy megváltoztatva hozzák kapcsolatba a tesztorganizmussal, ami módosíthatja a szennyezőanyag hozzáférhetőségét és ezáltal az aktuális toxicitását. A legtöbb jelenleg használt talajvizsgálatra alkalmas bioteszt a talaj extrahálószeres kivonatát vizsgálja, elhanyagolva a szennyezőanyag-talajszemcse, tesztorganizmus-talajszemcse (biofilm), tesztorganizmus-talajszemcse-szennyezőanyag kapcsolatokat és a hozzáférhetőséget (Gruiz, 1994 és 1998a).

A talajkivonat mellett foglal állást Sellner (1993), aki szerint a talajok fizikai, kémiai, biológiai összetétele olyan mértékben különbözhet egymástól, hogy referenciatalaj keresése helyett lényegesen egyszerűbb az azonos módon elvégzett extrakcióval nyert kivonat vizsgálata. Munkájában azonban azt is leírja, hogy az ily módon végzett tesztelés nem az ökoszisztéma veszélyeztetettségének megállapítására, hanem sokkal inkább a szennyezett minták kiválogatására illetve a talajminta időbeli változásának összehasonlító vizsgálatára (monitoring, talajtisztítás nyomonkövetése) alkalmas, és mint ilyen biológiai analitikai eljárásnak tekinthető.

Rönnpagel és munkatársai (1995) a talajkivonat használatával szemben a direkt érintkeztetést tartják fontosnak. Szerintük a talajkivonat készítésével túl- vagy alábecsülhető a toxicitás. Munkájukban két új, kontakt biotesztről: a *Bacillus cereus* és a kontakt *Photobacterium phosphoreum* tesztről számolnak be. Kutatásuk jelenlegi állása szerint ezeket a kontakt tesztek talajtisztítási folyamatok nyomonkövetésére és a remediált területek monitoringjára javasolják.

Az extraktum használata azért is problémás, mert a talajból történő extrakció a legtöbb szennyezőanyag esetén nem megoldott. Komplex szennyeződéseknel az extrahálószer szelektív kioldást eredményezhet.

3.3.3. Több fajt alkalmazó tesztek

Az egy fajt alkalmazó tesztek hátrányait igyekeznek kiküszöbölni a **több fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek**. Általában egymással kölcsönhatásban lévő és/vagy különböző trofikus szinteken lévő fajokat választanak tesztorganizmusként. A több fajt alkalmazó tesztek a 8. táblázatban foglaltuk össze.

A 8. táblázatban felsoroltak közül különösen jelentősek az ún. **mikrokozmosz tesztek**. A mikrokozmosz tesztek sem képesek a természetben lezajló folyamatokat tökéletesen modellezni, de az általuk szolgáltatott eredmény nagyobb biztonsággal vonatkoztatható a környezetre.

8. táblázat: Több fajt alkalmazó tesztek (Calow, 1993)

A bioteszt leírása	Vizsgált tulajdonság
Két baktérium törzs kompetíciós tesztje 5 napos teszt	A kompetíció eredménye
Mikrobiális préda-predátor teszt Időtartam: 3-5 hét	Préda, predátor egyedszáma
Mikrokozmosz tesztek Időtartam: 3-10 hét	Egyedszám, fajösszetétel, légzés, heterotróf aktivitás,
Mezokozmosz tesztek Időtartam: 5-6 hónap	Egyedszám, fajösszetétel, anyagcsere körforgalmak,

A 8. táblázatba sorolt mezokozmosz tesztek átmenetet képeznek a laboratóriumi mikrokozmosz és a szabadföldi vizsgálatok között. A mezokozmoszok szabadföldön létrehozott mesterséges rendszerek, amelyet a vizsgált kemikáliával szennyeznek, majd nyomon követik az ökológiai változásokat.

A környezetünket érő szennyezések hatását legpontosabban **szabadföldi vizsgálatokkal** jellemezhetjük. Ebben az esetben azonban ismernünk kell a terület „normális” ökológiáját és a folyamatban lévő természetes változásokat. A vizsgálati eredményt ugyanis sokszor meghamisíthatják a szennyezőanyagtól függetlenül bekövetkező, előre nem látható környezeti hatások, mint például vírusfertőzés vagy klímaváltozás.

A bioindikációs kísérletek a területre jellemző indikátor fajok legkülönbözőbb jellemzőit vizsgálják (Spellerberg, 1991), mint

- kihalás,
- betelepedés,
- invázió,
- fiziológiás változások.

A szabadföldi bioakkumulációs tesztek két fajtáját különböztethetjük meg: az aktív módszerek a területen élő fajokat, míg a passzív tesztek a betelepített fajokat

vizsgálják. A felhasznált tesztorganizmust a behatási idő eltelte után kémiai analízisnek vetik alá, és az akkumulált szennyezőanyag mennyiségéből következtetnek a terület szennyezettségére.

A szabadföldi vizsgálatok azonban költségesek, hosszú ideig tartanak, nagy szaktudást (botanika, zoológia, ökológia) és tapasztalatot igényelnek, így ma még csak kevéssé alkalmasak standard módszerekként való használatra.

3.4. Talajtesztek fajtái

Szennyezett talajok vizsgálatára, a talaj állapotának felmérésére, laboratóriumi illetve szabadföldi bioremediációs modellkísérletek és ipari léptékű remediáció követésére, valamint az ártalmatlanított területek utólagos monitorozására, az ökotoxikológiai módszerek közül a következőket használhatjuk.

Laboratóriumi tesztek

- A talajmintátt több, egy fajt alkalmazó ökotoxikológiai teszttel, párhuzamosan vizsgáljuk (a fajok között nem feltétlenül van ökológiai kapcsolat). A tesztek mindegyikének eredményét figyelembe vesszük a talaj jellemzősekor.
- Szennyezetlen, egészséges talajt 'tesztorganizmusként' kezelve, a vizsgálandó talajjal összekeverve (mikrokozmoszt létrehozva) vizsgáljuk. A szennyezetlen talaj eredeti, saját aktivitásának változásából mérjük a tesztelt talaj toxicitására.
- A vizsgálandó talajt mesterséges ökoszisztémának (mikrokozmosznak) tekintjük, ahol egymással kölcsönhatásban élő fajok élnek. Vizsgáljuk a talaj saját aktivitásainak változását a szennyezőanyag hatására. A talaj saját aktivitásának időbeni változásából következtetünk a toxicitásra.

Szabadföldi vizsgálatok

- Ökoszisztéma biomonitoring tesztek a remediált területeken a szabadföldi kísérletek nyomon követésére illetve utólagos monitorozásra alkalmazhatóak.

Bioszenzorok, biopróbák

- Mind szabadföldön, mind laboratóriumban használható módszerek.

A talajra alkalmas ökotoxikológiai tesztek tovább csoportosíthatjuk a használt tesztorganizmus szerint: egy és több faj, trofikus szint, stb. és a vizsgálat célja szerint: toxicitási teszt, mutagenitási teszt, biodegradációs vagy bioakkumulációs teszt, stb.

3.4.1. Egy fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek

Szennyezett talaj jellemzésére, bármilyen célból történjék is a vizsgálat általában nem elegendő egyetlen ökotoxikológiai tesztet alkalmazni, hiszen egyetlen tesztorganizmus igen rosszul reprezentálja a teljes ökoszisztémát. Ez azt jelenti, hogy párhuzamosan több, általában három, lehetőleg különböző trofikus szintekhez tartozó tesztorganizmussal végzett tesztelés szükséges. A különböző trofikus szintek lehetnek: baktérium, gomba, növény / alga, növényevő állat, ragadozó állat. A baktériumok és gombák a talajban a detritusz részét képezik, tehát a szervesanyagok lebontásában vesznek részt, a szervesanyagokat elemeire bontják, mineralizálják, miközben a szervesanyagokban kötött energiát hasznosítják. A növények és algák a napenergia befogásával ismét nagy energiataralmú szerves vegyületekbe kötik a mineralizált elemeket, amikor szervezetüket felépítik. Ezek az elsődleges termelők. A tápláléklánc további tagjai a növényevő állatok, majd a ragadozók.

3.4.1.1. Bakteriális tesztek

A szennyezőanyagok vizsgálatára széles körben használják a **bakteriális bioteszteket**. Ezek jelentősége az utóbbi időben megnövekedett. (Bitton és Dutka, 1986; Liu és Dutka, 1984) Elterjedésüket és népszerűségüket annak köszönhetik, hogy gyorsak és laboratóriumi körülmények között könnyen kezelhetők, valamint jól reprezentálják a legtöbb ökoszisztémát.

Bakteriális biotesztek a magyar szabványok között is találhatóak: az *Azotobacter agilis* teszt hulladék kivonat vizsgálatára (MSZ 21978/30-1988), a *Pseudomonas fluorescens* teszt talaj kivonat biotesztelésére (MSZ 21470-88), az *Azotobacter chroococcum* pedig talajblokk vizsgálatára (MSZ 08-1721/1-86) alkalmas.

A MicrotoxTM néven ismert teszt a *Vibrio*-nemzetséghez tartozó lumineszcens baktériumot használja szennyezőanyagok és szennyezett minták tesztelésére.

A DIN 38412 német szabvány a lumineszcens *Photobacterium phosphoreum*ot alkalmazza tesztelésre. Felhasználására rengeteg példa hozható.

A géntoxikológiai tesztek közül a már említett Ames-teszt, Mutatox-teszt és az SOS-chromotest is a bakteriális tesztek közé tartozik.

3.4.1.2. Növényi tesztek

A **növényi tesztek** esetében is érdemes megkülönböztetni az egysejtű növényeket, vagyis algákat alkalmazó teszteket a magasabbrendűeket használóktól.

Babich és Stotsky (1985) szerint a növények általában érzékenyebbek a szennyezőanyagokra mint a baktériumok. Számos bioteszt alacsonyabb- és magasabbrendű növényeket használ szennyeződések kimutatására.

Algatesztek

Az algák használata ökotoxikológiai vizsgálatokra általánosan elterjedt a világon, talajok esetén azonban csak a talajkivonat tesztelhető velük, így az algák a talajok ökotoxikológiai tesztelése szempontjából kisebb jelentőségűek.

Magasabbrendű növényi tesztorganizmusok

A **magasabbrendű növények** minden ökoszisztéma fontos tagjai, mivel a fotoszintézis útján biológiailag hozzáférhető energiává alakítják a fényt. A zöld növények védőréteget képeznek a talaj felszínén, megakadályozva a talajeróziót.

A magasabbrendű növényekkel végzett toxicitás tesztek végpontja a **pusztulás**, a **növekedés** (mérhető hosszban, súlyban, %-os takarásban) valamint a fotoszintetikus és a metabolikus **enzimaktivitások** lehetnek. A tesztelésre használt növényeket úgy választják ki, hogy laboratóriumi körülmények között könnyen kezelhetőek legyenek. A szabványok többnyire egynyári növényeket és fűféléket javasolnak. (8. táblázat)

Csírázásgátlási teszt

Széles körben szabványosított módszer (US EPA, 1989), amely során a vizsgálandó minta felületére helyezik a magvakat és 2-5 nap elteltével, megszámlálják a kicsírázott magok számát. Az MSZ 21976-17: 1993 tesztorganizmusként fehér mustármagot (*Sinapis alba*) használ, a veszélyes hulladéklerakókra vonatkozó US-EPA szabvány *Lactuca sativát*. Annak ellenére, hogy a csírázást egy kritikus életszakasznak tekinthetjük, kutatások szerint nem mindig elég érzékeny a toxicitás vizsgálatára, mivel a mag a belső tartalékait használja, és csak kisebb mértékben a környezetében található anyagokat.

Gyökérnövekedési teszt

A csírázásgátlási teszthez hasonló körülmények között, gyakran azonos kísérletben vizsgálják a kicsírázott magvak gyökereinek hosszát, amelyekből átlagot számítanak. A csírázás- és gyökérnövekedés-gátlást vizsgáló nemzetközi és hazai szabványmódszereket a 9. táblázatban foglaltuk össze.

Fotoszintetikus aktivitást vizsgáló tesztek

A környezet állapotának megítélésekor igen fontos paraméter a növények fotoszintetikus aktivitása, azonban ez számos tényező, így az évszakos változás, a különböző életszakasz, a hőmérséklet csakúgy, mint a fotoszintézis rendszer (C_3 , C_4 , CAM) függvénye. Ezért a fotoszintetikus aktivitás és a szennyezőanyag hatása között egzakt összefüggést megállapítani nehéz. A fotoszintetikus aktivitás vizsgálatára a fluorimetriás nyomon követés is alkalmas, ugyanis a klorofill fluoreszcencia jó indikátora a környezeti stressznek.

A növényi tesztorganizmusok megválasztásánál nagyon körültekintőnek kell lennünk, mert az egyes növények anyagcseréje nagymértékben eltérhet egymástól, egyes fajok nem alkalmasak, mert például egyes szennyezőanyagokra különlegesen érzékeny enzimrendszerrel rendelkeznek, vagy extrém gyökérsavakat, vagy más vegyületeket termelnek, mellyel a szennyezőanyagok hozzáférhetőségét nagymértékben befolyásolják. Ezek a fajok nem reprezentálják megfelelően a teljes ökoszisztémát, tehát ökotoxikológiai teszteszre nem vagy korlátozottan alkalmasak.

9. táblázat: Nemzetközi áttekintés a szabványosított növényi tesztekéről

	US EPA FIFRA (1982) ^a	OECD (1984)	US EPA RCRA / CERCLA ^b (1989)	US EPA TSCA ^c (1985)	US FDA ^d (1987)	APHA (1997)	MSZ 21976 (1993)
Vizsgált fajok	káposzta sárgarépa kukorica uborka saláta hagyma angolperje zab szójabab	kínai kel zsázsa saláta bab mustár zab reték repce rizs	saláta	káposzta répa kukorica uborka saláta zab hagyma angolperje szójabab paradicsom	bab káposzta répa kukorica uborka saláta zab angolperje szójabab paradicsom	japán köles rizs amerikai lótusz rizs vízitorma vad rizs	fehér mustár
Minta előkészítés	nincs	nincs	Magok válogatása méret szerint	a magok felületének sterilizése	magok áztatása 1 órával a kísérlet előtt	20 perc áztatás hipokloritban	nincs
Teszt-edény	petricsésze, szűrőpapír, homok, talaj	műanyag tálka, szitált talaj	petricsésze, szűrőpapír	petricsésze, homok,	petricsésze, kétréteg szűrőpapír	növesztő tálcán szűrőpapír	petricsésze, szűrőpapír
Tesztelt minta	bármilyen lehet	mintaoldat talajba keverve	4 ml / mintatartó	bármilyen lehet	nedvesített szűrőpapír	5 ml / mintatartó	nedvesített szűrőpapír
Magszám / edény	10	5	5	15	50	15	25
Ismétlések száma	4	>4	>3	3	6	4	2
Időtartam	5 nap	>14 nap	120 óra	> 65% csírázott	>50% csírázott mag	120 óra	72 óra
Végpont	csírázás, gyökérnövekedés, biomassa tömege	LC ₅₀ , EC ₅₀	csírázás, gyökérnövekedés, EC ₅₀	csírázás, gyökérnövekedés	csírázás, gyökérnövekedés	csírázás, gyökérnövekedés, biomassa tömege	csírázás, gyökérnövekedés, viszonyított relatív %

^aHolst & Ellwangen, 1982; ^bGreen et.al., 1989; ^cUS EPA, 1985; ^dUS Food and Drug Administration, 1987

A nemzetközi és magyar szabványok a növényi tesztek elsősorban veszélyes hulladékok oldatainak vizsgálatára javasolják. Ez nem jelent elvi vagy metodikai gátat a növényi tesztek talajra való alkalmazása esetén, csupán annyit jelent, hogy történelmileg, a hulladékok termőtalajra történő elhelyezésével kapcsolatban fejlesztették ki őket, elsősorban a vízbázisok, a felszín alatti vizek védelmének szol-

gálatában. A szabványosított módszerek talajkivonatra és pórúsvízre vonatkoznak. Teljes talaj vizsgálatára Gruiz és mtsai (1998b) a közvetlen érintkezést javasolják, melynek során megnyilvánulhatnak a talaj és a tesztnövény gyökérzetének kölcsönhatásai, melyek nem elhanyagolhatóak. Szerzők a teljes talaj és talajkivonat toxicitásának összehasonlítása alapján lehetőséget találtak a szennyező biológiai felvehetőségére és a hozzáférhetőségre vonatkozó információk nyerésére is, ami szennyezett talajok bioremediációja során rendkívül fontos paraméter.

A 8. táblázatban összefoglaltuk a növényi tesztorganizmusokkal szabványosított csírázásgátlásra, gyökér- vagy szárnövekedésre és biomasszanövekedésre alapozó teszteket. A növények csírázásán, gyökér- és szárnövekedésén kívül egy sor növényi enzimaktivitás is felhasználható ökotoxikológiai vizsgálati végpontként.

Biokémiai indikátorokat alkalmazó tesztek

A növényekben található enzimek közül a peroxidáz, a szuperoxid-dizmutáz és a glutation-S-transzferáz aktivitásának változásából következtethetünk a növény állapotára, így a szennyezőanyag által kiváltott stresszre.

Szimbiotikus nitrogén kötési teszt

A légköri nitrogén megkötése széles körben (genetika, morfológia, biokémia) vizsgált és jellemzett folyamat, ezért a szennyezőanyag által kiváltott hatásra következtethetünk a folyamatban történt változásból.

3.4.1.3. Állati tesztorganizmust alkalmazó módszerek

Számos **egysejtű és többsejtű állatot** alkalmazó ökotoxikológiai teszt leírása található a szakirodalomban. Legszélesebb körben használt tesztorganizmus a földigiliszta, az *Eisenia fetida*.

Földigiliszta tesztek

Különböző célokra többféle szabványosított földigiliszta tesztrendszer létezik, leírásuk az alábbiakban, összefoglalásuk pedig a 10. táblázatban található.

- **Akut toxicitás teszt**

A vizsgált oldattal illetve talajkivonattal nedvesített szűrőpapírra helyezik a tesztorganizmust, majd 24 és 48 óra elteltével megszámlálják az elpusztult egyedeket. A talajkivonatra kapott eredményből azonban a talajra vonatkozó következtetések csak nagy körültekintéssel vonhatók le.

- **Mesterséges talaj teszt**

Nemzetközi szabványok szerint (OECD, 1984; EEC, 1985) a tesztelendő minta szuszpenzióját a mesterséges talajba (10% tőzeg, 20% kaolin agyag, 70% kvarc-

homok, pH=6) keverik, amelyre ráhelyezik a tesztorganizmusokat, majd 7 és 14 nap elteltével megszámlálják az elpusztult gilisztákat.

Riepert és Kula (1996) standardizált és körmérésekkel alátámasztott jól reprodukálható módszert ír le peszticidek hatásának mérésére.

- **Artisol teszt**

Az artisol teszt esetében (Ferrière, Fayolle és Bouché, 1981) a vizsgálandó oldatot szilikagélbe (Artisol) keverik. 7 nap után az elpusztult egyedeket eltávolítják a gél felszínéről. Végpontként a túlélő egyedek száma szolgál.

- **Szubletális toxicitás teszt**

Van Gestel és munkatársai (1989) által kidolgozott eljárásban az *E. fetida* egyedeket a vizsgálandó mintát is tartalmazó mesterséges talajba keverik. 3 hét elteltével tömegméréssel meghatározzák a giliszták növekedését, valamint megszámlálják a keletkezett kokonokat. A kokonokból további 5 hét inkubálás után kikelő gilisztákat vizsgálják, meghatározva ezzel a szaporodóképességet.

10. táblázat: Földgiliszta tesztek

Teszt típusa	Szubsztrát	Giliszta-szám	Idő-tartam	Végpont	Ismétlések száma	Környezeti realizmus
Akut tesztek						
Szűrőpapír teszt	extraktum, kivonat, pórusvíz	1 / tartó	24-48 h	Pusztulás	10 / konc.	kicsi
Mesterséges talaj teszt	Mesterséges talaj (500g)	10 / tartó	14 nap	Pusztulás	4 / konc.	jó
Artisol teszt	Amorf szilikagél	10 / tartó	14 nap	Pusztulás	4 / konc.	kicsi
Szubletális tesztek						
Mesterséges talaj teszt	mesterséges talaj	10 / tartó	3 hét	Felnöttek növekedése kokonszám	4 / konc.	jó
Peszticid teszt	mesterséges talaj	10 / tartó	6 hét	Felnöttek növekedése kokonszám	4 / konc.	jó

Egyéb állati tesztszervezetek

Az eukariota egysejtűek közé tartozó **protozoák** a talaj pórusvizében élő élőlények, nagyon érzékeny testorganizmusok. Annak ellenére, hogy számos kutató és szakirodalom foglalkozik velük (Sauvant et al, 1999) szabványosított módszer nem létezik. A protozoák közül a *Tetrahymena pyriformis*, a *Colpoda cullus* és a *Paramecium aureliat* használják ökotoxikológiai testorganizmusként (Haight, és mtsai, 1982; Sturhan, 1986; Van Kessel, 1989).

A talaj pórusvizében élő protozoákon kívül a fonálféreg (Nematoda) széles körben vizsgált testorganizmusok. Népszerűségüket annak köszönhetik, hogy a már korábban vizek vizsgálatára kifejlesztett és sokat tanulmányozott tesztekhez hasonló körülmények között vizsgálhatóak.

A **fonálféreg**ek közül a *Panagrellus redivivus* organizmust az Országos Közegészségügyi Intézetben, Vargha Béla (1995) használja, szennyezett vizek és hulladékkivonatok tesztelésére.

A talajlakó **egyenlőlábúak** (*Isopoda*) a talajban lévő nehézfémeket felveszik és testükben akumulálják, ezért a bioakkumulációs tesztek népszerű testorganizmusai (Dallinger és Wieser, 1977; Eijsackers, 1978; Van Capelleveen, 1987; Hopkin, 1990). A használt fajok a *Porcellio scaber*, az *Oniscus asellus* és a *Trichoniscus pusillus*.

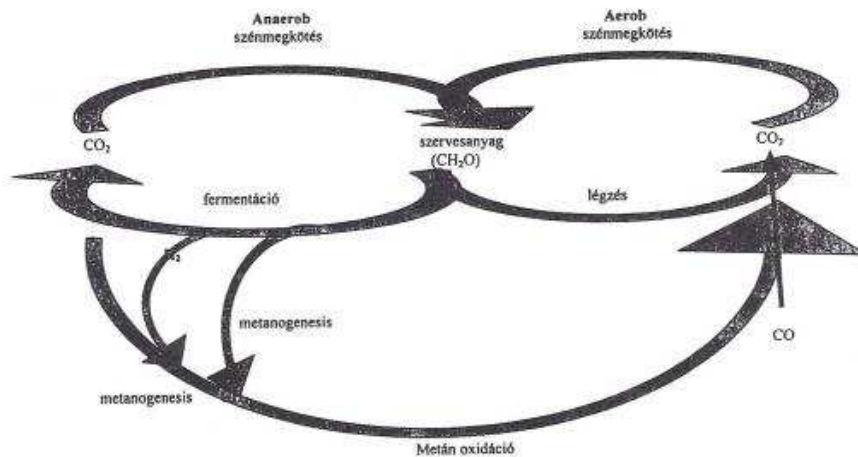
Számos **ugróvillás** (*Collembola*) fajt használnak talajvizsgálatra, így az *Onychiurus* fajokat (Eijsackers, 1978; Mola, 1987), a *Folsomia candida* (Tomlin, 1977; Iglisch, 1986), a *Tullbergia granulata* (Subagja és Snider, 1981) az *Orchesella cincta* (Van Straalen és munkatársai, 1989). A fent említett testorganizmusok közül a *Folsomia*-teszt nemzetközileg szabványosított tesztmódszer (ISO/TC 190 SC4, WG2). Az ugróvillás rovar hasi légzőtüdején keresztül beléggzéssel és bőrkontakt útján mérgeződhet. Ritkán, pl. éhezéskor a tápcsatornán keresztül közvetlenül is felvehet szennyezőanyagot, egyéb esetben a táplálékláncon keresztül a talajból akumuláló gombafajok elfogyasztásával exponálódik. A teszt során a vizsgálandó talajba helyezik az állatokat. Akut hatások vizsgálata esetén 5-14 nap elteltével a letalitást vizsgálják, krónikus hatások és a reprodukció vizsgálatára minimum 3 hetes tesztet javasolnak (Riepert és Kula, 1996).

3.4.2. A talaj saját aktivitásainak mérése mikrokozmoszban

A mikrokozmoszban, más néven **mesterséges ökoszisztéma tesztekben** általában egymással kölcsönhatásban lévő és/vagy különböző trofikus szinteken lévő fajokat választanak testorganizmusként.

A mesterséges ökoszisztémákban vizsgált paraméterek a betelepített vagy eleve meglévő testorganizmusok biokémiai, fiziológiai és ökológiai viselkedése, valamint a teljes mikrokozmoszra jellemző szénanyagcsere, nitrogén anyagcsere vagy például a dehidrogenáz enzim aktivitás.

3.4.2.1. Biodegradációs tesztek, szénanyagcsere vizsgálatok



14. ábra: Szénforgalom a földi ökoszisztémában

A biodegradáció aerob vagy anaerob folyamat, melynek során a talaj mikroorganizmusai feltárják és mineralizálják, vagyis a növények számára ismét felvehető szerves állapotba hozzák azokat a biogén elemeket, amelyek részt vesznek a szerves anyagok felépítésében, az energia raktározásában és transzportjában. Ez biztosítja a szervesanyag termelésének szakadatlanságát. A biodegradáció mértéke határozza meg egy adott ökoszisztémán belül az elemek körforgalmának sebességét.

Nagy jelentőséggel bír a hulladékok kezelésében és ártalmatlanításában, a környezetszennyezettség biológiai úton történő eltávolításában, a környezet öntisztulásában és természetes helyreállításában.

A biodegradációt a biotechnológusok széles körben alkalmazzák a települési és termelési hulladékok komposztálásakor, szennyezett talajok, szennyvizek biológiai kezelése, tisztítása során. A biotechnológia központi folyamata a mikroorganizmusok biodegradációs tevékenysége, melyhez az optimális körülményeket a technológia biztosítja: levegőztetés, hőmérséklet, nedvességtartalom, tápanyagellátás, adalékanyagok, stb.

A szennyezőanyagok biodegradálhatóságának nagy szerepe van a környezeti kockázat felmérésében. A kockázat a biodegradálhatósággal fordítottan arányos, minél inkább biodegradálható egy szennyezőanyag, annál kevesebb ideig lesz jelen a környezetben.

Egy szennyező vegyi anyag általános és lokális (helyspecifikus) biodegradálhatósága nagymértékben eltérhet a mikroflóra adaptálódása miatt. Tehát helyspecifikus kockázat felmérése esetén mindig a lokális, pl. a helyszínen található

szennyezett talajból mért biodegradációból kell kiindulni. Különösen fontos ez, ha szennyezett területek öntisztulását vagy *in situ* remediációs technológiákat kívánunk tervezni vagy követni.

A biodegradáció során átalakulnak a molekulák, megváltozik fiziko-kémiai természetük és tulajdonságaik. Az elsődleges biodegradáció mennyiségileg is meghatározható az eredeti komponensek eltűnésének követésére alkalmas analitikai módszerekkel. Szerves talaj-szennyezőanyagok kimutatására széles körben elterjedt a gáz- és a folyadékkromatográfia használata nagy szelektivitásának és érzékenységeinek köszönhetően. Az elsődleges biodegradáció fontos jellemzője, hogy általában az eredeti komponensek toxikus tulajdonságainak elvesztésével jár.

A biodegradáció eredménye a vegyületek lebomlása, az összes szerves szén CO_2 -dá való átalakulása, és/vagy szerkezeti anyagként a biomasszába történő visszatérése. Így végeredményben a biodegradáció a szerves szén, a nitrogén és egyéb makro-, mezo- és mikroelemek mineralizációjához vezet.

A biodegradáció nyomon követésére, mértékének megállapítására szolgáló módszerek gyakran olyan detektálási technikák, amelyek direkt vagy indirekt módon mérik a szerves szén oxidációját.

Egyes szerves szennyezőanyagok bontásához gyakran nem szükségesek különleges enzimek, mások viszont speciális enzimrendszerek meglétét feltételezik. Egyszerű szénhidrogének bontásához például általában inkább a hozzáférhetőséget növelő, pl. felületaktív anyagokat termelő törzsek jelenléte szükséges. Gyakran a talajban kis arányban előforduló fajok feldúsulása elegendő a könnyen biodegradálható szennyezőanyag szubsztrátként való hasznosulásához, más esetekben specifikus gén vagy gének kombinációi szükségesek (pl. klórozott szénhidrogének, egyes peszticidek, kometabolizmussal bomló szerves vegyületek). Ezek a génkombinációk vagy képesek spontán kialakulni mutációk és *in situ* genetikai rekombinációk sorozatán keresztül, vagy nem. Ha spontán kialakult a bontásra alkalmas fajösszetétel, akkor a technológia a folyamat sebességét növelő optimalizációra szorítkozhat, ha nem, akkor a biotechnológusnak a bontóképesség kialakításáról is gondoskodnia kell (pl. talajoltás szelektált vagy génmanipulált törzsekkel).

A biodegradációs vizsgálatok egyik célja tehát a környezeti elem biodegradációs képességének vizsgálata, a másik a szennyezőanyag biodegradálhatóságának, perzisztenciájának vizsgálata, mely mind a környezeti kockázat nagyságának megállapítása, mind pedig a remediáció tervezése szempontjából fontos jellemző. A környezeti kockázat nagysága fordítottan arányos a vegyi anyag biodegradálhatóságával: minél tovább van a környezetben, annál tovább képes káros hatását kifejteni. A remediációs technológia saját kockázatának megítélésénél is fontos faktor a degradálhatóság: ettől függ a maradék szennyezettségből eredő maradék kockázat. Főképpen *in situ* remediációs technológia alkalmazása esetén kell a bonthatatlan maradékok mennyiségével és minőségével foglalkozni.

CO₂ -termelés és az O₂ -felvétel mérésére

A CO₂ -termelés és az O₂ -felvétel mérésére alkalmas standard módszer nem vegyületspecifikus, de segítségével a szerves szén oxidációjának folyamata nyomon követhető, valamint jellemezhető mind a szennyezőanyag bonthatósága, mind a szennyezett talaj állapota és adaptációs képessége.

Mineralizáció követése ¹⁴C jelzett szubsztrátokkal

Kis koncentrációjú szerves molekulák mineralizációjának követése ¹⁴C-jelzett származékaik segítségével is történhet. A szennyezőanyag fogyasztásával direkt módon követhető a biodegradáció.

A talaj biodegradációs aktivitását, a már elkezdődött vagy folyó biodegradációt nem egyszerű mérni. Általában standardizált labor tesztek alapján extrapolálunk.

A szennyezőanyag biodegradációját vizsgáljuk, de ha stabil közti- vagy végtermék van, annak elemzését is el kell végezni. Egy gyakran használt, egyszerűsített modell a biodegradáció kinetikáját elsőrendűnek tekinti, csak az oldott részt veszi biodegradálhatónak, és a biodegradáció sebességi állandóját arányosnak veszi a mikrobapopuláció koncentrációjával (EU-TGD, 1996).

A talajban folyó biodegradáció sebességi állandóját a vízben folyó degradáció ismert állandójából számítja:

$$k_{\text{degtalaj}} = k_{\text{degviz}} * F_{\text{pórusvíz}} * 100 / K_{\text{talaj-víz}}$$

$K_{\text{talaj-víz}}$ a vegyi anyag megoszlási hányadosa = $C_{\text{talaj}} / C_{\text{pórusvíz}}$

k_{degtalaj} a talajban folyó degradáció sebességi állandója

k_{degviz} a vízben folyó degradáció sebességi állandója

$F_{\text{pórusvíz}}$ a pórusvíz frakciója a talajban.

Ezek a leegyszerűsített egyenletek nem veszik figyelembe, hogy a biológiai folyamatok olyan aktív felületeken és különleges transzportviszonyok között játszódnak le, melyeket csak modell kísérletekkel vagy mikrokozmosz kísérletekkel lehet szimulálni (Gruiz, 1997).

A vegyületek, szennyezőanyagok biodegradációja egy adott rendszerben számos faktor függvénye. Fontos különbséget tenni a szennyezőanyaggal illetve a rendszerrel összefüggő paraméterek között.

A molekulaszervezettel összefüggő paraméterek

Néhány általános következtetés adódik a molekulák struktúrájából, méretéből és a hozzájuk tartozó biodegradálhatóság kapcsolatából. A szerves molekulák biodegradálhatósága egyértelmű összefüggésbe hozható az illékonyssággal, a vízzoldhatósággal, illetve az oktanol-víz megoszlási hányadossal. Néhány további összefüggést az alábbiakban foglalunk össze:

- Általában a nagy molekulású vegyi anyagok nem tudnak áthatolni a sejtmembránon, ezért a sejt enzimatikus reakcióinak hatása lelassul, a sejten kívüli enzimek limitálják.
- A könnyen hidrolizálható észterkötések lehetővé teszik a nagy molekulák kisebbekre hasadását; ezek aztán gyorsabban biodegradálhatóak. A hidrolízis hidrolitikus enzimek hatására történik és gyakran hatékonyabb és gyorsabb, mint a kémiai hidrolízis.
- A vízoldhatóság elősegíti a vegyület transzportját és a biodegradációt.
- A tercier szénvegyületek (elágazó alifás szénláncúak) általában rezisztensek a biodegradációval szemben.
- A halogénnel való helyettesítés lelassítja vagy gátolja az aerob biodegradációt, pl. klórbenzol származékok esetében.
- A policiklikus aromás szerkezeteket nehezebb biodegradálni, mint az egyszerű benzolszármazékokat vagy mint az alifás szénláncúakat.
- Etilén-oxid származékokon alapuló felületaktív ágenseket könnyebb biodegradálni, mint a propilén-oxidon alapuló homológokat.

A rendszerrel összefüggő paraméterek:

- **Tesztközeg** - Számos esetben (például az O₂-felvételt és CO₂-termelést detektáló tesztekben) fontos, hogy a tesztelendő vegyület képviselje a rendszerben az egyetlen szénforrást. Ez nem reprezentálja a természetes körülményeket, de megkönnyíti a laboratóriumi tesztelést.
- **Inokulum** - Egy vegyület biodegradációjának aránya és mértéke, a jelenlévő specifikus degradáló mikroorganizmusok számának függvénye. Ezért fontos, hogy megbizonyosodjunk arról, megfelelő mennyiségű és minőségű degradáló mikroorganizmus áll-e rendelkezésre. A tesztek általában egy adott beoltási szintet javasolnak.
- **pH** - Ha a rendszerben a pH=5 alá süllyed, a mikroorganizmusok abnormális eloszlása jöhet létre. Foszfát vagy kalciumkarbonát pufferolt rendszert lehet használni a pH beállítására.
- **Oxigén** - Aerob tesztekben a tesztközegben minimum 2mg/l oxigén-koncentráció javasolt.
- **Hőmérséklet** - A mikroorganizmusok széles hőmérsékleti skálán képesek élni. Aerob mikroorganizmusoknál ez 4-35 °C, míg anaeroboknál 10-65 °C. Rendkívül fontos a hőmérséklet szigorú ellenőrzése, mivel szelektív hatása lehet a jelenlévő fajokra, és befolyásolhatja a biodegradáció arányát.
- **Expozíciós idő** - A vizsgált vegyület expozíciós ideje a sejtnövekedési arány és az enzimes adaptációs mechanizmusok miatt kap fontos szerepet.

- **Szubsztrátkoncentráció** - A toxikus összetevők koncentrációja nem érheti el azt az értéket, amely már gátolja a jelenlévő mikroorganizmusok működését.

A biodegradáció tesztelése során a céltól függően kell kiválasztani a legmegfelelőbb tesztrendszert és a detektálási módszert. Fontos azonban, hogy ezek összeegyeztethetők legyenek a tesztelendő anyag tulajdonságaival.

A biodegradáció mérésére vonatkozó előírások a detergensnek; a felületaktív anyagok és az ipari vegyszerek biodegradálhatóságára vonatkozó módszereket tartalmazzák.

A legfontosabb OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), EC (European Economic Community) és ISO (International Organisation for Standardization) által standardizált tesztek összehasonlító listája a 11. táblázatban található. A detergensnek biodegradálhatóságára vonatkozó OECD által ajánlott módszerek egy screenelési tesztet és egy ellenőrző tesztet foglalnak magukban. Ezek a kiindulási anyag tesztközegekből történő eltűnését vizsgálják.

Az anionaktív detergenset (MBAS) spektrofotometriás úton mérik metilénkék-aktív anyaggal. A nem ionos detergensnek - amelyek legalább 5 mól etilénoxidot tartalmaznak - mérésére végpontként a komplex formában levő bizmut potenciometriás titrálását használják. Ez a bizmut-aktív anyagok (BiAS) detektálási módszere. Ezeket a teszteket főleg szennyvízre és szennyvíziszapra dolgozták ki, de tapasztalatunk szerint talajra (talajszuszpenziókra) is adaptálhatóak.

Az ipari vegyi anyagok biodegradálhatóságának vizsgálatára az OECD irányelveket adott közre, amelyek a biodegradációs tesztek 3 szintjét foglalják magukban, a könnyen biodegradálódók, a nehezebben biodegradálódók és a valós szennyeződés vizsgálatát.

Könnyen biodegradálható szennyezőanyagok bontásának tesztelésére kidolgozott ún. „ready” biodegradálhatósági teszt lényege, hogy egy különböző aerob mikroorganizmusokat tartalmazó, kis mennyiségű inokulumot adott pH-n, adott hőmérsékleten inkubálunk. A tesztvegyyszer az egyetlen szénforrás. A biodegradálhatóság mérésének alapja lehet az oxigénfogyasztás, a széndioxid termelés vagy az oldott szerves szén (DOC) eltűnésének mérése.

A **nehezebben biodegradálható vegyi anyagok**, az ún. „inherens” biodegradálhatósági tesztben nagyobb az inokulum mennyisége. A tesztkomponens : biomassza reálisabb aránya jellemző, a szennyvízkezelés feltételeihez hasonlóan. Nagyon hosszú az érintkezési idő a tesztkomponens és az eleven iszap között. Főképp a DOC fogyással határozzák meg a biodegradáció mértékét.

A **szimulációs tesztben** DOC analízist végeznek. A tesztfeltételek viszonylag közel állnak a valódi szennyvízkezeléshez; szintetikus kiindulási anyag helyett valódi szennyvizet is alkalmazhatnak.

11. táblázat: Szabvány módszerek szennyezőanyagok biodegradálhatóságának mérésére

Cél / végpont	Teszt rendszer	Detektálás	Referensek
Anionaktív és nem ionos detergensek			
Detergens fogyasztása	OECD screen	MBAS és BiAS	OECD (1971), EC 73/405, 82/243, 82/242
Eleveniszap szimulálása	OECD ellenőrző teszt	MBAS és BiAS	OECD (1971), EC 73/405, 82/243, 82/242
Ipari vegyi anyagok			
biodegradálhatóság screenelése (RBS)	BOD teszt	O ₂ felvétel	EC 84/449
biodegradálhatóság screenelése (RBS)	zárt palack teszt	O ₂ felvétel	OECD (1981) EC 84/44; ISO 5815
biodegradálhatóság screenelése (RBS)	elektrolitikus légzésmérő	O ₂ felvétel	OECD (1981), EC 84/449; ISO DIS 9439
biodegradálhatóság screenelése (RBS)	módosított CO ₂	CO ₂ fejlődés	OECD (1981); EC 84/449; ISO DIS 9439
biodegradálhatóság screenelése (RBS)	módosított OECD screen	DOC fogyás	OECD (1981) EC 84/449
biodegradálhatóság vizsgálata (IBS)	MITI-2 teszt	DOC fogyás	OECD (1981)

RBS = Ready Biodegradable Substance = jól biodegradálódó vegyi anyag

IBS = Inherently Biodegradable Substance = nehezen biodegradálódó vegyi anyag

Biodegradálhatóság, felezési idők, sebességi állandók

A talaj és a felszíni vizek üledékeiben folyó biodegradációról általában nincs információnk. Ezekre a környezeti elemekre jellemző biodegradáció sebességi állandóját standard tesztek eredményeiből kaphatjuk meg becsléssel. A 12 táblázat vízi ökoszisztémában folyó biodegradáció elsőrendű sebességi állandóit és a felezési időket mutatja könnyen és nehezen biodegradálódó anyagokra (EU TGD, 1996).

12. táblázat: Felezési idők és sebességi állandók összefüggése vízi rendszerben

Teszteredmény	Sebességi állandó (k) 1/nap	Felezési idő nap
Könnyen biodegradálódó	$4,7 * 10^{-2}$	15
Könnyen, de nem 10 napon belül	$1,4 * 10^{-2}$	50
Nehezen biodegradálódó	$4,7 * 10^{-3}$	150
Nem biodegradálódó	0	∞

A 13. táblázat a talajban és az üledékben érvényes felezési időket mutatja a biodegradálhatóság és vegyi anyag megoszlási hányadosa (K_p) függvényében. Minél hidrofóbabb a vegyület, annál jobban fog kötődni a talaj (üledék) szilárd frakciójához, tehát annál kevesebb lesz elérhető a vizes fázisban a biodegradáló mikroorganizmusok számára. Emiatt a sebességi állandó ezeknél a vegyi anyagoknál nagyobb.

13. táblázat: Felezési idők biodegradációs tesztek alapján, a K_p függvényében

K_p (lit/kg)	Felezési idő talajban (nap)		
	Könnyen biodegradálódó	könnyen, de > 10 nap biodegradálódó	Nehezen biodegradálódó
≤ 100	30	90	300
$> 100 \leq 1000$	300	900	3000
$> 1000 \leq 10\ 000$	3000	9000	30\ 000
stb.	stb.	stb.	stb.

A sebességi állandó és a felezési idő közötti összefüggést a következő egyenlet adja meg:

$$k_{\text{biotalaj}} = \frac{\ln 2}{DT_{50\text{biotalaj}}}$$

Az oxigén felvételén alapuló módszerek

- **Zárt palack teszt**

A zárt palack teszt (OECD 301D, 1981; EC 84/449 C6, 1984) módszer a klasszikus BOD (Biochemical Oxygen Demand) tesztből származik. Ez a módszer ásványi oldatot használ és az expozíciós idő 28 nap a BOD tesztben meghatározott 5 nap helyett. A tesztek legnagyobb előnye, hogy oldhatatlan anyagokra is alkalmazhatók. Nagy probléma viszont, hogy a mikroorganizmusok számos különböző reakcióban hasznosítják az oxigént, mint például a tesztanyagban levő nitrogén és foszfor oxidációjához.

- **A légzés mérésén alapuló módszerek**

A légzés mérésén alapuló módszereknél (OECD 310C, 1981; EC 84/449 C7, 1984) a teszt kivitelezése során mennyiségi oxigén meghatározást végeznek, és az eredményeket a teszt vegyszer biodegradációjához viszonyítják.

A modernebb módszerekben elektrolitikus úton mérik az oxigén mennyiségét.

- **Blok teszt**

A Blok teszt (Blok, 1979) a BOD és a DOC méréseket kombinálja. Oxigén elektródot használ az oxigén-fogyás mérésére vizes közegben.

Az oxigénfogyasztást mérésével majdnem mindig helyettesíthetők a széndioxid fejlődését mérő tesztek Talaj esetében előnyösebb is az oxigénfogyasztás mérése, mert a talajoknál gyakori karbonát tartalomból esetleges savanyodás miatt származó CO₂ nem zavarja a mérést.

- **CO₂ fejlődést mérő tesztek**

A szerves szén oxidációjának legközvetlenebb kimutatása a biodegradáció folyamán a termelt CO₂ mérése. A CO₂ fejlődést mérő tesztek alkalmasak a talaj állapotának felmérésére, a talajtisztítási technológia tervezésére és megalapozására (a szennyezőanyag biodegradálhatóságának vizsgálata alapján), valamint a technológia követésére.

A teszt könnyen alkalmazható ¹⁴C jelzett származékokra.

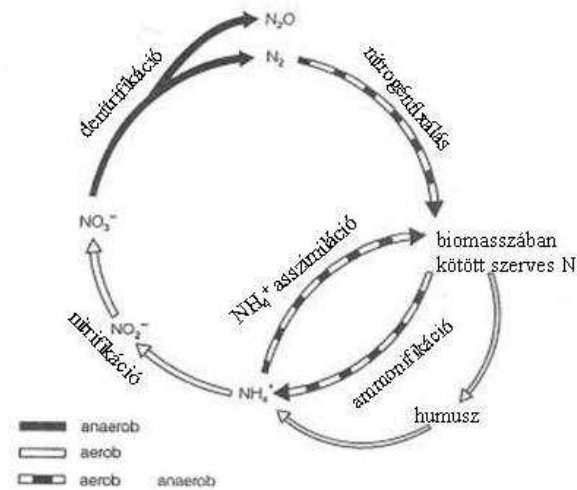
Anaerob biodegradációs tesztek

Az anaerob biodegradáció során a szerves szubsztrát mikrobiális úton lebomlik oxigén hiányában, s a szén széndioxiddá és metánná alakul.

¹⁴C-jelzett származékok alkalmazása során a ¹⁴CO₂ és a ¹⁴CH₄ termelődése az anaerob biodegradáció közvetlen bizonyítéka (ECETOC 1988).

Brown & Laboureur (1983) kifejlesztettek egy módszert, mely az eredeti molekulák eltűnésének mérésével, követésével figyeli az anaerob biodegradációt.

3.4.2.2. Nitrogénanyagcsere vizsgálatok



15. ábra: Az ökoszisztéma N-körforgalma

Ammonifikációt és nitrifikációt vizsgáló tesztek

Az egyik eljárás a szerves N-vegyületek lebomlása során keletkező N₂ mennyiségét méri a talajlégzés-vizsgálatokhoz hasonló körülmények között. Egy másik teszt az ammónia oxidációját NO₂-nél megállítja, így a nitrifikálódott mennyiség elkülöníthető a talaj saját NO₃ tartalmától.

Légköri nitrogén megkötés vizsgálata

A szimbiotikus nitrogén-fixálási teszt a növények gyökerén található *Rhizobium*ok által elősegített légköri N₂ megkötést tanulmányozza. A vizsgálandó talajt *Rhizobium*mal beoltják, majd a növény növekedését vizsgálják. A nem szimbiózisra alapuló N-megkötési teszt az acetilén – etilén átalakulást vizsgálja a talajban.

Denitrifikációs teszt

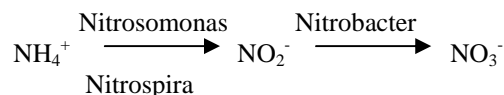
A teszt az anaerob körülmények között lejátszódó NO₃ – N₂ átalakulást vizsgálja. A teszt a talajban található anaerob zónák jellemzésére szolgál.

Az 15. ábrán látható N-körforgalomban a nitrifikációt és a N₂-megkötés specializálódott baktériumok végzik, míg a többi folyamatért számos nem specializálódott baktérium felel.

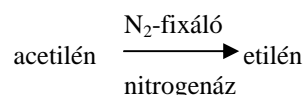
Szabványosított tesztek

Szabványosított tesztek a következő folyamatokra léteznek:

- **Autotróf nitrifikáció**



- **Légköri N megkötése**



3.4.2.3. Talajenzimek aktivitásának vizsgálata

A tesztek során különböző enzim, így az ureáz, a dehidrogenáz, foszfatáz, celluláz, stb. enzim aktivitását mérhetjük. A mérés során problémát okozhatnak az extracelluláris enzimek, amelyek a mikroorganizmusok eltávolítása után is aktívak maradnak a talajban (Sommerville és Greaves, 1987). Abszolút értékük a talajt csak akkor jellemzi jól, ha össze tudjuk hasonlítani a szennyezést, illetve a remediáció elkezdését megelőző értékkel.

Természetes biodegradáció és remediáció követésére, technológiamonitringra alkalmasak a talaj enzimaktivitását mérő módszerek. A talaj enzimaktivitáshoz köthető biológiai jellemzésére az egyik megoldás a **határhígításos eljárás**. Ez az enzimaktivitást mutató sejtek számának meghatározására alkalmas, az enzimaktivitás megjelenésének indikálása alapján. Ilyenkor az enzimes reakció termékének mennyiségi meghatározása nem történik meg, pusztán vizuálisan értékeljük a növekedést, vagy az enzimes reakció közti- vagy végtermékét, annak valamilyen reagenssel vagy indikátorral kimutatható színes termékét. A másik elterjedt eljárás az, hogy az enzimaktivitás hatására megjelenő terméket mennyiségi analitikai módszerrel mérik, pl. spektrofotométerrel határozzák meg az enzimes reakció termékével, reagens vagy indikátor hatására létrejött színes terméket.

A jó minőségű, szennyezetlen referencialajhoz adott vizsgálandó, feltételezetten toxikus talaj lecsökkentheti az eredeti enzimaktivitást. Ilyen alapon a referencia talaj, mint tesztorganizmus alkalmazható ökotoxikológiai teszteléshez.

3.4.2.4. A talaj teljes ATP tartalmának meghatározása

Az ATP mennyiségi vizsgálatának eredménye az energiatermelés mértékére ad felvilágosítást. Az adenzin-trifoszfát (ATP) a sejtek általános energiátároló vegyülete, így minden sejtben megtalálható. Az ATP mennyisége a sejtszámmal és a sejt aktivitásával arányos. Az ATP mennyiségi kimutatására a luciferin lumineszcens fény kibocsátása melletti, ATP-t igénylő átalakulását használhatjuk.

Az ATP biolumineszcencia a következő egyenleten alapul:



AMP = adenzin monofoszfát, PP_i = szervetlen foszfát

A keletkezett fény mennyiség arányos az ATP mennyiségével, ez pedig a sejtszámmal illetve a sejtek energiatermelésével.

A sejtszám meghatározási módszerekkel összehasonlítva a biolumineszcencia alkalmazásával a mérési idő lerövidül és a pontatlanság is kiküszöbölhető, mert egy igen érzékeny és jól reprodukálható módszert ötvöztek a gyorsasággal.

Az ATP meghatározásának fontos kérdése, hogy hogyan és mikor nyerjük ki az ATP-t a sejtekből. A biológiai rendszerek ATP forgalma igen nagy. Az ATP forgalom a sejt teljes ATP-tartalmának 270-450 szerese a növekvő baktériumokban. Azok a módszerek, melyekkel a sejtek feltárását végzik igen gyorsak, így a metabolizmusban nem okoznak változást.

A sejtek feltárását már többféle anyaggal próbálták, többek között: triklór-acetáttal (TCA), perklórsavval (PCA), szerves oldószerekkel (etanol, butanol), pufferekkel és szulfát tartalmú vegyületekkel. A fenti vegyületek közül a legjobb feltárást TCA-val tudták elérni és a Tris/EDTA oldat zavart a legkevésbé a fényképződésben, hasonló mértékű feltárást mellett.

A feltárásnál mindig olyan anyagot kell alkalmazni, amely nem lép kölcsönhatásba vagy reakcióba az ATP-vel. Így kerülni kell az Mg^{2+} tartalmú vegyületet, valamint acetát, Cl^- , Br^- , NO_3^- , I^- , SCN^- , ClO_4^- ion használatát. A luciferáz reakciót főleg az anionok inhibeálják, így ezek használatát minden körülmények között kerülni kell különösen a fent említetteket. A luciferáz reakció optimális pH-ja 7,75, tehát ezen érték körül kell dolgozni a legjobb eredmény érdekében.

Az ATP tartalom abszolút értéke önmagában nem jellemzi a talajt toxikusság vagy a szennyezőanyag biodegradálhatósága szempontjából, az ATP tartalom változása viszont egy természetes folyamat vagy egy vezetett technológia során, jól jellemezheti a talajt és a benne lejátszódó folyamatokat. A jó minőségű, nem szennyezett, referencia talajhoz kevert szennyezőanyag okozta csökkenés is mérhető, tehát a referenciatalaj, mint tesztorganizmus használható ökotoxikológiai teszteléshez.

3.4.2.5. Rezisztencia vizsgálatok

A talaj mikroflórájának adaptálódására adhat felvilágosítást a szennyezőanyagokkal szembeni rezisztencia mértékének és a rezisztens fajok számának vizsgálata.

A teljes talajra vonatkozó jellemzőkből (enzimaktivitások, sejtszámok, stb.) direkt következtetést vagy jellemzést csak rezisztenciavizsgálat után javasolt végezni, ugyanis a megváltozott, toxikus környezethez adaptálódó rezisztens fajok elszaporodása eredményezheti pl. a légzés növekedését nagymennyiségű szerves anyaggal történt szennyeződés esetén, még akkor is, ha az egyéb, érzékeny fajok kihaltak.

3.4.3. Ökoszisztéma biomonitring és szabadföldi tesztek

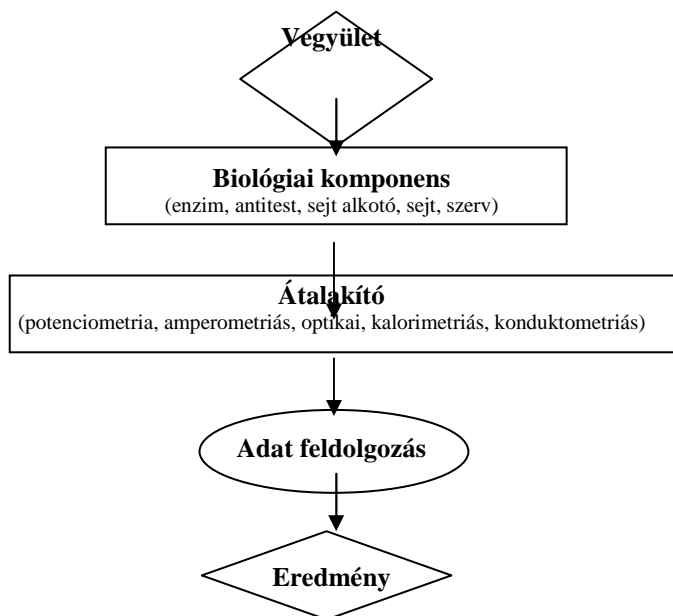
A szabadföldi vizsgálatok célja lehet szennyezett terület állapotfelmérése, egy szennyezett területen megindult természetes remediációs folyamat (natural attenuation) ellenőrzése vagy *in situ* remediáció követése és utómonitoringja.

A szennyezett területek szabadföldi vizsgálatánál alkalmazott ökotoxikológiai módszerek nem azt az eljárást követik, hogy a területről vett mintákat beszállítjuk az ökotoxikológiai laboratóriumba, és ott teszteljük őket, hanem azt, hogy a szennyezett területen az ökoszisztéma biomonitring eszköztárából ismert, *in situ* méréseket alkalmazunk.

A szabadföldi vizsgálat lehet aktív és passzív biomonitring. Az **aktív módszer** során az általunk kiválasztott fajokat helyezzük a környezetbe, míg a **passzív módszer** esetén, a területen élő fajokat vizsgáljuk. Az ökoszisztéma biomonitring teszteket a következő módon csoportosíthatjuk:

- Az életközösség összetételét és működését vizsgáló tesztek (fajösszetétel, fajszám, érzékeny fajok kihalása, tápláléklánc vizsgálatok, a teljes ökoszisztéma anyag- és energiaforgalma)
- Az életközösség genetikai jellegzetességének vizsgálata (rezisztens fajok megjelenése, génpróbák)
- Bioakkumulációs tesztek
- Biomarkerek (stressz fehérjék, metallothionein, citokrom P450, apoptózis) Az akkumulációra képes organizmusok vitatott szerepet töltenek be a biomonitring tesztek között, ugyanis az általuk szolgáltatott eredmény erősen függ néhány abiotikus (víz, pH, hőmérséklet, sótartalom) és biotikus (a tesztorganizmus kora, neme, mérete, testének lipidtartalma) tényezőtől. A bioakkumuláció azonban kétségtelenül hangsúlyos szerephez jut a szennyezőanyagok kockázatának becslése során, ahol a cél nem pusztán a környezet állapotának nyomon követése, hanem a szennyezőanyag hatásának és táplálékláncba kerülésének és feldúsulásának (biomagnifikáció) vizsgálata.
- Bioindikátor fajok:
 1. *Őrző fajok*: a vizsgált területre telepített, nagy érzékenységgű fajok, amelyek elpusztulásukkal korai figyelmeztető rendszerekként szolgálnak,
 2. *Detektor fajok*: a vizsgált területen élő fajok, amelyeknek szennyezőanyag hatására megváltozik a viselkedésük, korösszetételük, esetleg elpusztulnak,
 3. *Kiaknázó fajok*: rezisztens fajok, amelyek szennyeződés esetén kompetíciós előnyben vannak a többi fajjal szemben,
 4. *Akkumuláló fajok*: felveszik és akkumulálják a szennyezőanyagot kémiai analitikával kimutatható mennyiségben.

3.4.4. Bioszenzorok, biopróbák



16. ábra: A bioszenzor felépítése

A környezeti monitoringban használt bioszenzorokat a 14. táblázat foglalja össze.

14. táblázat Bioszenzorok a környezeti monitoringban (Calow, 1992)

Tesztelt vegyület	Biológiai komponens	Átalakító
2,4-dinitrofenol	monoklonális antitest	potenciometriás elektród
Fenolok	polifenol-oxidáz	amperometriás elektród
Nitrit	nitrit reduktáz	NH ₃ gázszenzor
Naftalin	<i>Pseudomonas</i> + lux kódolt plazmid	fotoelektronsokszorozó
Triazin növényvédőszer	enzim immunoassay	UV spektrofotométer
Formaldehid	formaldehid dehidrogenáz	piezoelektromos kristály
Hg(II)	ureáz	CO ₂ elektród
Szerves foszforsav szárm.	acetilkolin észteráz	pH elektród
Nehézfémek	ureáz	mikrokaloriméter
Karbamát rovarirtó	acetilkolin észteráz	pH érzékeny száloptika
Gyomirtók	<i>Synechococcus</i>	amperometria
Klor-fenolok	<i>Escherichia coli</i>	amperometria

3.4.5. Szennyezett területek jellemzése

A terület jellemzésére, az ökológiai károsodás felmérésére, az adaptáció nyomon követésére, a természetes remediáció (öngyógyítás) és az öntisztulás követésére a szennyezett területek kezeléséhez nagy szükség van. A szennyezett területtel kapcsolatos intézkedéseknek, kockázat mérséklő- vagy csökkentő intézkedéseknek figyelembe kell venniük a terület ökológiai állapotát, történetét, a területhasználatától függő célokat.

Szennyezett területek károsodásának mértékét nem egyszerű megállapítani. Nincs abszolút eredményt adó mérő módszerünk, de még relatíve sem könnyű megítélni egy-egy terület ökoszisztémájának állapotát. Általában, adathiány miatt nem tudjuk a területet korábbi, szennyeződés előtti önmagához viszonyítani, legfeljebb más, hasonló adottságokkal és ökológiai jellemzőkkel bíró területhez. Sokszor még ilyen referenciaterületet sem könnyű találni.

Azt sem tudjuk teljes biztonsággal, és erre még egyezményes megállapodás sincs, hogy mikor mondhatjuk egy terület ökoszisztémájáról azt, hogy még nem károsodott, vagy hogy már károsodott. Kutatási stádiumban van az ökológiai jellemzők mérése, mennyiségük és minőségük alapján történő állapotfelmérés, és ennek a jövőre vetített változata, előrejelzése, vagyis a kockázatfelmérés.

A szennyezett területek ökológiai rendszeréről sok esetben fontos tudnunk, hogy mennyire károsodott, milyen trendek uralkodnak, mi várható a jövőben.

A természetes környezet, az ökoszisztéma nagyfokú adaptációs képességgel bír. Első ránézésre gyakran nem állapítható meg egy terület károsodása, az élet látható nyomainak megvannak, zöldell, virágzik, ebihalak úszkálnak benne, stb. A károsodást és a kockázatot csak az alaposabb vizsgálódás, például fajeloszlás felmérése mutatja meg, vagy az érzékeny fajok számának csökkenése, esetleg kipusztulása, mutánsok szelektálódása, rezisztens fajok és/vagy azok rezisztenciáért felelős génjeinek megjelenése, a bioakkumuláció és a biomagnifikáció megindulása. Ezek a látható felszín alatti változások tetten érhetőek, biológiai és kémiai mérési adatok alapján.

Ebben a fejezetben azokról a módszerekről adunk áttekintést, amelyek hosszabb idő óta szennyezett területek állapotának, ökológiai károsodásának felmérésre alkalmasak. Ezek a módszerek segítenek képet alkotni arról, hogy a szennyezett területen a szennyeződés bekövetkezése óta folyó és az eredetihez képest megváltozott működése során egyensúlyba került-e, és hogy ez az új egyensúly elfogadható-e, vagy kockázatos-e az ember szempontjából. Az ökológiai kockázat nem azonos a humán egészségkockázattal. A helyi ökoszisztéma hozzászokhat extrém nagy toxikus anyag koncentrációkhoz (pl. extrém As háttérérték esetén, vagy bányavidékek nagy fémtartalmú kőzetein vagy hulladékain, veszélyes anyagot tartalmazó tavakban, szénhidrogénnel szennyezett területeken, stb.), a természet ismét egyensúlyba került, de az ott élő, azt a területet használó ember kockázata azzal nem csökken, hogy a rezisztenssé vált és az új egyensúlyt megtaláló ökoszisztéma túlélte a káros anyagok környezetbe kerülését.

Az ismertető módszerek eredményei megmutatják a szakember számára, hogy megindult-e a szennyezett terület spontán öngyógyítása, öntisztulása.

A talaj élővilága minden oda bekerülő szerves vagy szervetlen anyagra reagál. Ha biodegradálható, akkor degradálni fogja, hogy belőle energiát termeljen, és sejtjeit felépítse. Ha nem biodegradálható és toxikus szennyezőanyagról van szó, akkor beindul ennek a toxikus anyagnak a semlegesítéséért felelős mechanizmus. A talaj élővilágának nagyfokú adaptációját egy sor biokémiai és genetikai folyamat eredményezi. Ezek részletesebb megismerésére azért van szükség, mert ezek a mechanizmusok adnak alkalmas vizsgálati módszereket a kezünkbe.

A szennyeződés hatására bekövetkező első és legnyilvánvalóbb változás a **fajok eloszlásának** megváltozása. Az érzékenyebbek, a szennyezőanyagot szubsztrátként hasznosítani nem tudók relatív mennyisége csökken, az ellenállók (pl. toxikus fém-szennyeződés esetén) és/vagy a szennyezőanyagot szubsztrátként (pl. biodegradálható szénhidrogének) hasznosítók feldúsulnak. Az érzékenyek arányának csökkenése elvezethet egyes fajok végleges kihalásához is.

A talaj élővilágának adaptációja során két jellemző és bizonyító erejű folyamatot indikálhatunk. Az egyik a biodegradáció, mely a bontható szennyezőanyagra, mint szubsztrátra specializálódott élőlények, főleg mikroorganizmusok megjelenését, feldúsulását jelenti. A másik a rezisztencia kialakulása és a bioakkumuláció, amely fémek és nem bontható szerves szennyezőanyagok esetében jelent megoldást az ökoszisztéma egyes tagjainak, amelyek úgy igyekeznek szabadulni a káros hatástól, hogy a káros anyagot kikapcsolják az anyagkörforgalomból, immobilizálják sejtjeik vagy szöveteik biztonságos, saját anyagcseréjük számára sem hozzáférhető raktáraiban. Eközben a környezeti koncentráció sokszorosa alakulhat ki az ellenálló faj sejtjeiben. Az ilyen, bioakkumuláló élőlényeket fogyasztó, a táplálékláncban felettük álló élőlényeknek, még fokozottabb rezisztenciával kell bírniuk, hogy a bioakkumulációval növelt koncentráció bevitelét is tolerálni tudják. Ezt a jelenséget, vagyis a táplálékláncon keresztül történő hatványozott bioakkumulációt nevezzük biomagnifikációnak. Bioakkumulációra majd minden élőlény képes, de a trofikus lánc alacsonyabb szintjein lévőkkel kezdődik a baj, így a terület veszélyes mértékű szennyezettségének kimutatás is ott lehetséges legelőször, vagyis a baktériumok és a növények esetében.

A biodegradáció, a rezisztencia és/vagy a bioakkumuláció megjelenése, indikálása és bizonyítása különböző vizsgálati szinteken lehetséges. A változások az ökoszisztémában megjelennek, konkrétan, vizuálisan is érzékelhető módon, fajok minőségében és mennyiségében. Ennek már korán is felismerhető, kimutatható és mérhető fiziológiai, biokémiai, enzimológiai alapjai vannak. Ha még mélyebbre ásunk, akkor ezen biokémiai jellemzők genetikai alapjaira lehetünk, amelyeket a mai kor modern géntechnikái segítségével direkt módon is ki tudunk mutatni.

Az adaptációért felelős gének gyakran mozgékony genetikai elemekhez kötődnek a sejtekben, pl. plazmidokhoz vagy transzpozonokhoz. Ennek az az értelme a természetben, hogy ezek a nem mindig, csak néha szükséges tulajdonságok könnyen és gyorsan el tudnak terjedni egy mikroba populációban. A mozgékony genetikai

elemek nem csak a tulajdonság terjedését, de a felelős gének kimutatását, vagy ki-nyerését is megkönnyítik.

Vizsgálhatjuk tehát a talajban

- a fajeloszlást, hagyományos identifikálási módszerekkel,
- az életjelenségeket,
- a biokémiai vagy enzimológiai jellemzőket hagyományos módszerekkel,
- a genetikai jellemzőket, modern géntechnikákkal.

Bármilyen szintű vizsgálati módszert alkalmazunk, csak egy időbeli adatsor vagy egy szennyezetlen referenciaterülethez való viszonyítás után nyerhetünk reális képet egy terület állapotáról.

Mivel a szennyezett területek spontán megindulnak az öngyógyítás és/vagy öntisztulás útján, bizonyos esetekben a technológusnak ezeket a folyamatokat alapul véve, mintegy integrálva kell terveznie a remediációs technológiát. Nagy területek régi szennyeződéseinél szinte mindig a természetes folyamatokra alapozzuk a bioremediációs technológiát, megtartva a természetes folyamatok előnyeit, hatékonyabbá téve a talajmikroflóra működését, ezzel csökkentve a remediáció időigényét.

3.4.5.1. Fajeloszlás

A fajeloszlás időbeni változása jól jellemez egy területet, főként, ha a szennyeződés előtti állapot is ismert. Ha nincs idősorunk vagy megbízható referenciaterületünk, akkor óvatosan kell bánnunk az eredményekkel, hiszen a szennyeződés hatására bekövetkező szelekciókat nem tudjuk megkülönböztetni a szezonális változásoktól, vagy az olyan egyszeri eseményektől, mint például egy vírusfertőzés vagy nem átlagos hőmérséklet.

Üledéklakó gerinctelenek fajeloszlása

Elsősorban felszíni vízi ökoszisztémák jellemzésére alkalmas a makrozoobenthosz, az üledéklakó makrogerinctelenek vizsgálata. A vizsgálat során az egyes fajok előfordulási gyakoriságát és összetételét határozzuk meg. Szennyezett és károsodott területeken az érzékeny fajok hiányát és a fajok számának csökkenését mérhetjük. A mérési adatokból a szakirodalom által javasolt indexeket alkotunk, melyek számértéke arányos a károsodással.

Folyóvizek, patakok esetében az élőlények begyűjtése ún. kőgörgetéses technikával történhet, amikor a kövek aljára tapadó élőlényeket az áramló vízzel mosatjuk le, és a folyásirány szerint lejjebb, planktonhálóval gyűjtjük őket össze. A hálóban összegyűlt állatkákat formalinba helyezzük. A fajeloszlás meghatározását és a fajok azonosítását a laboratóriumban végezzük el mikroszkóp és határozó segítségével. Folyóvizek esetén a folyás irányában mérhető változások, gradiensek értékes felvilágosítást adnak, amely értékek egymáshoz képest értelmezhetőek, referencia vagy korábbi adatsorok nélkül is.

Állóvizek, tavak üledéklakóit az üledékből markolóval kivett mintából vizsgáljuk. A markolóval felszínre hozott üledéket planktonhálóba tesszük, majd vízszűrővel kimossuk belőle az üledék szemcséit. A hálón fennmaradó élőlényeket formalinban tartósítjuk, majd a laborba szállítás után meghatározzuk az egyes fajok egyedszámát, amiből eloszlást számítunk. Referencia és korábbi adatsorok hiányában csak durva értékelés végezhető, pl. az eredményekből származtatott indexek nagyságát irodalmi adatokkal vagy a vizsgálatot végző tapasztalatával tudjuk összevetni.

Szárazföldi növények fajeloszlása

A szárazföldi növények fajeloszlása a szárazföldi ökoszisztémák károsodását, adaptálódását, a feltételezett vagy valós szennyezőanyag ökoszisztéma károsításának megnyilvánulását mutatja. A fajok számának csökkenése, az érzékeny fajok hiánya, a rezisztens fajok relatív arányának növekedése utalhat a szennyeződésre és a már bekövetkezett károsodásra. A felmérés a szennyezett területen és egy nagy körülményekkel kiválasztott referenciaterületen történik, párhuzamosan. A mintavételre statisztikai alapú eljárások léteznek. A fajok azonosítására növényhatározó segédanyagot használunk. A nem azonosított, vagy bizonytalan fajokat laboratóriumba szállítás és szárítás után is lehet azonosítani. Az eredményekből eloszlás-görbéket lehet felvenni, és indexeket kreálni.

3.2.5.2. Biodegradáció

Egy szennyezett területen folyó biodegradáció indikálása, mennyiségi és minőségi jellemzése összetett feladat. A biodegradáció jellemzése különféle szinteken történhet: a szennyezőanyag koncentrációjának monitorozásától, a biodegradációra képes sejtek mennyiségi és minőségi jellemzésén és aktivitásuk biokémiai-enzimológiai jellemzésén keresztül, a biodegradációban szerepet játszó enzimek gégeinek kimutatásáig, gyakoriságuk méréséig.

Egy régebből öröklött, szennyezett területen folyó biodegradáció mértéke kémiai módszerekkel nyert eredmények alapján jellemezhető a szubsztrát fogyásával, minősége pedig a szubsztrát illetve a maradék összetételével.

A légzés mértéke, a termelt széndioxid, vagy az elfogyasztott oxigén mennyisége szintén a biodegradációt jellemzik.

Speciális bontóképességű mikroorganizmusok jelenléte bizonyító erejű a biodegradációt illetően.

A biodegradációban szerepet játszó enzimeket aktivitásuk alapján, enzimreakciók segítségével, enzim-analitikai eljárásokkal mutathatjuk ki. Az enzimeket, mint fehérjéket immunanalitikai eljárásokkal is indikálhatjuk. Az ilyen vizsgálati rendszereket korai figyelmeztető rendszerként is működtethetjük.

A biodegradációért felelős mikroorganizmusok szennyezőanyagot bontani képes enzimjeit kódoló gének jelenléte és előfordulási gyakorisága a legközvetlenebb jellemzője a biodegradációnak. A modern géntechnikák, a hibridizáció és a polimeráz láncreakció (PCR) ezeknek a géneknek a meglétét képesek kimutatni.

A hibridizáció során a felelős gént, a vele komplementer szerkezetű, radioaktív vagy enzim jelölést hordozó m-RNS próba segítségével találhatjuk meg. Ma már izolálás és tenyésztés nélkül, direkt a talajból lehet hibridizációt végezni egyes gének jelenlétének bizonyítására.

A PCR technika alkalmazásával még nagyobb érzékenységet tudunk elérni, már egy-két gén jelenlétét is ki tudjuk mutatni az eljárás hatványozó képessége miatt. A modern géntechnikák alkalmazásának feltétele, hogy hibridizációs próbák illetve primer (indító) molekulák birtokában legyünk. Ezeket ismert, a biodegradációért felelős gének nukleotid szekvenciája alapján tudjuk előállítani. A szakirodalom, az adatbankok egyre több, környezetvédelem szempontjából jelentős gén nukleotid szekvenciáját tartalmazzák.

3.4.5.3. Rezisztencia

A talaj mikro- és makroflórájának rezisztenciája is egy olyan tulajdonság, amely szorosan összefügg az adaptációval, a szennyezett területre kikerült vegyi anyagokhoz való kényszerű hozzászokással. A rezisztencia megléte bizonyítja a hosszabb időn keresztüli szennyezettséget, az ökoszisztéma egyensúlyának valószínűsíthető eltolódását és figyelmeztet arra a kockázatra, ami az ökoszisztéma adaptálódása és túlélése ellenére az emberre nézve létezik.

A rezisztencia, mint tulajdonság egy biokémiai folyamat eredménye, egy rezisztenciáért felelős gén által kódolt enzim, amely a toxikus (vagy más káros hatású) vegyi anyag hatásának semlegesítését végzi. A rezisztenciáért felelős vegyület lehet enzim, amely elbontja vagy módosítja a káros anyagot, de lehet olyan fehérje is, amely immobilizálja, biológiailag hozzáférhetetlenné teszi a káros vegyi anyagot.

Szerves szennyezőanyagok esetén a rezisztencia együtt járhat a biodegradáló képességgel.

Szervetlen szennyezőanyagok és perzisztens szerves szennyezőanyagok esetében a rezisztencia többnyire immobilizációt jelent. Az immobilizáció történhet sejten kívül, a sejtmembránban vagy a sejten belül kialakított raktározó sejtstruktúrákban oldhatatlan granulátumok formájában. Az immobilizálás leggyakrabban nagy méretű fehérjékhez kötődést és kicsapódást, esetleg kristályos formájúvá alakulást jelent. A sejten, szervezeten belüli immobilizálás a bioakkumuláció alapja is.

3.4.5.4. Bioakkumuláció

A bioakkumuláció az élőlények azon tulajdonsága, hogy bizonyos anyagokat szervezetükben koncentrálnak, vagyis nagyobb koncentrációban tartalmazzák, mint a környezet. A sejten belüli és a környezetben mérhető koncentráció arányt a biokoncentrációs faktorról (BCF) jellemezhetjük. A biokoncentrációs faktor kémiai-analitikai eredmények alapján képezhető, mint a belső és külső koncentráció hányadosa. A koncentrációértékek mérésén kívül kimutathatjuk, illetve mérhetjük a bioakkumulációért felelős fehérjéket vagy az azokat kódoló géneket.

3.5. Géntechnikák az ökotoxikológiában

Az élet minden területén rohamosan terjed a géntechnikák alkalmazása, ez alól a környezetvédelem, az ökológia, az ökotoxikológia sem kivétel. A géntechnikák áttekintése és csoportosítása látható a következőkben.

3.5.1. Speciális gének kimutatása hibridizációs próbával

- Mikroorganizmus sejtek számának meghatározása általánosan elterjedt gének alapján, kevésbé szelektív hibridizációs próbák segítségével.
- Speciális gének kimutatása specifikus DNS vagy RNS próbákkal,
- xenobiotikumok bontásáért,
- rezisztenciáért,
- bioakkumulációért felelős gének kimutatása.

3.5.2. Speciális gének kimutatása PCR segítségével

A polimeráz láncreakció segítségével mutatjuk ki egy bizonyító erejű gén jelenlétét, a géntermék fehérje aminosavszekvenciája alapján meghatározott primerek segítségével. Ezek a gének lehetnek:

- Indikátor gének,
- korai figyelmeztető gének,
 - biodegradációért felelős gének,
 - rezisztenciáért felelős gének,
 - bioakkumulációért felelős gének.

3.5.3. Speciális gének kimutatása a géntermék alapján

Speciális, egyes ökoszisztéma tagokra vagy funkciókra jellemző géntermékeket immunanalitikai módszerekkel, a kimutatandó fehérjére kifejlesztett monoklonális antitestek segítségével végezzük.

- Biodegradációért felelős enzimek,
- rezisztenciáért felelős fehérjék és
- bioakkumulációért felelős fehérjék kimutatása.

4. Talajökotoxikológiai módszerek leírása

Ebben a fejezetben ismertetjük és jellemezzük azokat az ökotoxikológiai módszereket, amelyek Európában szabványosak, vagy jelenleg folyik a szabványosítás módszertani előkészítése és olyanokat, melyeket saját vagy irodalmi tapasztalat alapján ajánlunk talajok, üledékek és pórúsvíz vizsgálatára. A módszerek alkalmasak a vizsgálandó talaj előzetes minősítésére, szennyezett területek kockázatának megítélésére, bioremediációs technológiák megalapozását szolgáló laboratóriumi, illetve szabadföldi kísérletek követésére, valamint a remediált területek utólagos monitorozására. Az itt felsorolt tesztek mindegyikét alkalmazzuk a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén. A tesztek jellemzőit elsősorban saját tapasztalataink alapján összegeztük.

Hígításra és/vagy összehasonlításra OECD talajt vagy ismert, bizonyítottan tiszta erdei talajt használunk. Az OECD talaj főzögből és agyagásványokból összeállított, állandó minőségű, mesterséges talaj.

A tesztorganizmus és a talaj direkt érintkezése talajnedves állapotban vagy iszapállagban történhet.

Egyes teszteknel szárított és porított talajt használunk, és azt utólag nedvesítjük, más esetekben az eredeti földnedves állapotú talajt használjuk. Egyes bakteriális tesztmódszereknél a talaj előzetes sterilizése is szükséges lehet.

A talaj és üledék minták esetében, a talaj szilárd fázisától elkülöníthető talajnedvesség vagy pórúsvíz vizsgálatára alkalmas tesztek és teszteljárások is szerepelnek. A pórúsvizet illetve a talajnedvességet gravitációsan, ha szükséges centrifugálással nyerjük ki a talajból.

Bizonyos esetekben, így környezeti kockázatelemzés céljából vagy kioldhatósági, mobilizálhatósági kísérleteknél, valamint a szennyezőanyag megoszlásának (szilárd-víz) tanulmányozásakor, talajkivonat vizsgálatára van szükség. A talajkivonatot 3x, 5x, vagy 10x-es vízmennyiséggel vagy más oldószerrel, pl. szerves savakkal készíthet.

4.1. Egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek

4.1.1. Bakteriális biotesztek

A laboratóriumi tesztek közül a baktériumokat alkalmazók a leggyorsabbak és legegyszerűbbek. Három, alapvetően különböző kivitelű bakteriális ökotoxikológiai tesztet dolgoztunk ki és alkalmazunk talajok komplex jellemzésére.

A *Vibrio fisheri* egy tengeri baktérium, általános érzékenységű tesztorganizmus. Azt a különleges tulajdonságát használjuk a teszteléshez, hogy fényt emittál. Ezt a luxustevékenységet kedvezőtlen körülmények között azonnal beszünteti.

A *Bacillus subtilis* tesztbaktériumot speciális célra szelektáltuk, egy adott szennyezett területre jellemző toxikus fémszennyeződés érzékelésére. Érzékenysége közepes, vagyis nem túl érzékeny, csak a valóban nagy fémtartalmat érzékeli ezzel lehetővé teszi a kockázatos minták kiszűrését.

A harmadik, a veszélyes hulladékok vizsgálatában elterjedten alkalmazott és egyszerű mérést és értékelést biztosító laboratóriumi tesztorganizmusunk egy tipikus talajbaktérium, az *Azotobacter agile*, mely nem szelektív, nagymértékben érzékeny tesztorganizmus.

4.1.1.1. *Vibrio fischeri* lumineszcencia-gátlása

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, bakteriális, akut toxicitási teszt.

Alkalmazása: pórusvízre, talajkivonatra és teljes talaj vizes szuszpenziójának vizsgálatára (iszapállag).

Tesztorganizmus: *Vibrio fischeri*, másnéven *Photobacterium phosphoreum* az EPA és DIN szabványokhoz liofilezett formában kapható, de mikrobiológiai laboratóriumban is könnyen fenntartható.

A *Vibrio fischeri* érzékenysége: mind nehézfémekre, mind szerves makro- és mikro-szennyezőanyagokra érzékeny.

Végpont: lumineszcencia intenzitáscsökkenése, a minta hígítási sorából EC_{20} , EC_{50} határozható meg.

Szükséges műszer: luminometer.

Tesztelés időtartama: 30 perc.

Szabvány módszerek:

- US EPA Microtox
- DIN 38412, 1991
- Teljes talajra és direkt kontaktra kidolgozott változat: BME-MGKT.

Alkalmazási területe: előzetes és részletes állapotfelmérés, kockázatfelmérés, remediáció követése, ellenőrzése, utómonitoring.

Megjegyzés: jól reprodukálható, viszonylag érzékeny teszt.

Inokulumkészítés

A tesztorganizmust ferde agaron tartjuk fent, kéthetenkénti átoltással. A fenntartáshoz használt tápagar összetétele azonos az alábbiakban ismertetésre kerülő *Photobacterium phosphoreum* tápoldattal, melynek 1000 cm^3 -ét 17 g agar-aggal szilárdítjuk meg.

A vizsgálatához használt baktérium-szuszenzió előállítása két lépésben történik. Első lépésként 24 órán át, $28\text{ }^\circ\text{C}$ -on rázatott lombikos inokulumot állítunk elő, majd ennek 1 cm^3 -ével 20 cm^3 tápoldatot oltunk be. 24 órás, $28\text{ }^\circ\text{C}$ -on történő rázítás után

a sejtuszpenzió használható mérésre. A mérés érzékenysége függ az inokulum kezdeti fénykibocsátásától, melyet a luminométer beütésszámmal jellemez. Előzetes mérések alapján, ha LUMAC luminométert használunk, a beütésszámot 10 000-50 000 értékre célszerű beállítani. Az inokulum hígítása 2 %-os NaCl-oldattal történik. A beütésszám 30 perces állás után állandósul, így a felhígított inokulum használható mérésre.

A *Photobacterium phosphoreum* inokulum készítéséhez használt tápoldat összetétele 1000 cm³ desztillált vízremegadva a következő:

30 g	NaCl
6,1 g	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O
2,75 g	K ₂ HPO ₂
0,204 g	MgSO ₄ *7H ₂ O
0,5 g	(NH ₄) ₂ HPO ₄
5 g	pepton
0,5 g	élesztőkivonat
3 cm ³	glicerin
pH	7,2

A tápoldat sterilizése autoklávban 121 °C-on, 10 percig történt.

A vizsgálatokhoz használt Cu-oldat

A mérés érzékenysége erősen függ a kezdeti beütésszámtól illetve a hőmérséklettől, ezért a minták mellett standard Cu-sor lumineszcencia-gátlását is mérjük. A különböző mérési sorozatok eredményét mindig az aktuális Cu-sor eredményéhez viszonyítjuk.

Az alkalmazott Cu-standard-sorozat tagjainak koncentrációi: 0,4, 4, 20, 40, 400 ppm ($2 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-2}$ mg Cu). A felhasznált Cu-só: CuSO₄*5H₂O. A standardok készítéséhez 2%-os NaCl-oldatot használunk. A mérés kontrolljaként nehézfémeket nem tartalmazó 2%-os sóoldatot szolgál. Környezeti víz-minták esetén a hígítási sor elkészítése előtt érdemes megmérni a hígítatlan minta lumineszcencia gátlását, ez ugyanis sok esetben szükségtelemmé teszi a hígítást, ha nem toxikus a minta.

Folyadék fázisú minták tesztelése *Photobacterium phosphoreum*mal

A talaj vizes illetve extrahálószeres kivonatára, valamint a talajnedvesség vizsgálatára a folyadékfázisú tesztet használjuk.

A lumineszcencia gátlás meghatározása luminométerrel

1. A mérőműszer mintatartóiba 0,2-0,2 cm³ inokulumot mérünk.
2. A minta hozzáadása nélkül megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I₀)

3. Az inokulumhoz $0,05 \text{ cm}^3$ -t mérünk a minták felkevert hígításaiból. A standard Cu-sor tagjaiból ugyancsak $0,05 \text{ cm}^3$ -t mérünk be. A kontroll mintához $0,05 \text{ cm}^3$ 2%-os NaCl- oldatot mérünk.

4. 30 perces kontakt idő leteltével megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I_{30}).

A mérés kiértékelése

15. táblázat: A folyadékminták értékelése

Minta	I_0	I_{30}	$f=I_{30k}/I_{0k}$	$I_{szám}=f \cdot I_0$	$H\%=100 \cdot \frac{(I_{szám}-I_{30})}{I_{szám}}$
kontroll	I_{0k}	I_{30k}			
Cu ₁	I_{0Cu1}	I_{30Cu1}			
Cu ₂	I_{0Cu2}	I_{30Cu2}			
Cu ₃ /mg/	.	.			
Cu ₄	.	.			
Cu ₅	.	.			
minta ₁	I_{0m1}	I_{30m1}			
minta ₂	I_{0m2}	I_{30m2}			
. /ml/	.	.			
.	.	.			
.	.	.			
.	.	.			

I_0 - A mintatartóba mért inokulum kezdeti lumineszcencia intenzitása

I_{30} - 30 perccel a minta hozzáadása után mért lumineszcencia intenzitás

f - A kontroll minta 30, illetve 0, percben mért lumineszcencia intenzitásának hányadosa

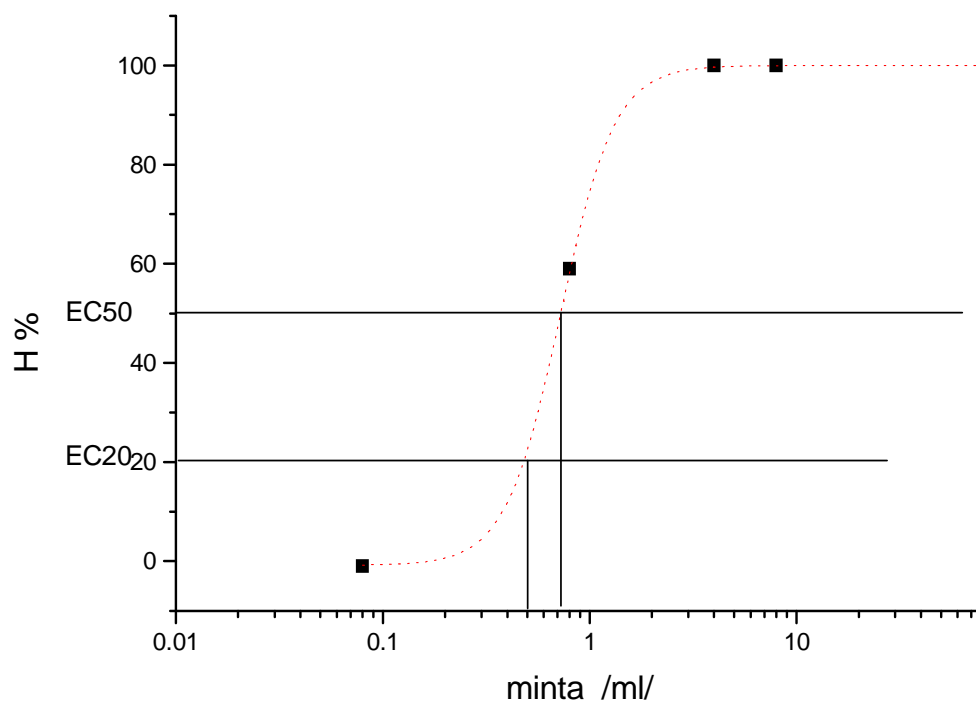
Iszám - Számított lumineszcencia intenzitás, amelyet a vizsgált minta venne fel 30 perces behatási idő után, ha toxikus anyag nem lenne jelen.

H% - a vizsgált minta okozta %-os lumineszcencia intenzitás-csökkenés

Az EC_{20} és EC_{50} értékek grafikus meghatározása

A számított adatok segítségével egy $H\%$ - log bemért anyag (ml eredeti minta) görbét szerkesztünk, amelyről leolvassuk a 20%-os illetve az 50%-os fényintenzitás-csökkenéshez tartozó koncentrációértéket (lásd 17. ábra).

Ezeket EC_{20} illetve EC_{50} értéként kezeljük. Réz esetén ugyancsak megszerkesztjük a diagramot: $H\%$ -log (bemért mg Cu), és az EC_{20Cu} illetve EC_{50Cu} értékeket leolvassuk.



17. ábra: Az EC₂₀ és EC₅₀ értékek grafikus meghatározása folyadékfázisú mintánál

Szilárd fázisú minták vizsgálata *Photobacterium phosphoreum* mal

A szilárdfázisú minták vizsgálatakor a következő szempontokat vettük figyelembe:

- Ha a talaj illetve üledékminták ökotoxikológiai vizsgálata azok kivonataiból történik, a nagyfokú hígulás miatt érzékenységsökkenéssel kell számolni. Ugyanakkor számos a talaj ill. üledék szempontjából fontos kölcsönhatási formát, - szennyezőanyag–talajszemcse, tesztorganizmus–talajszemcse, tesztorganizmus–talajszemcse-szennyezőanyag - nem veszünk figyelembe.
- A minták és a tesztorganizmus direkt érintkeztetése esetén azonban mérés-technikai problémákkal kell számolni. A minta jellegétől függően ugyanis a mintaszuszpenzió zavarossága (fényáteresztő, elnyelő tulajdonsága) különböző lehet. Ez viszont befolyásolja a luminométer fotoelektron-sokszorozójába érkező fény intenzitását. Megoldást jelenthet egy olyan kontroll minta, amely fizikai-kémiai, biológiai jellegét tekintve azonos a vizsgált talajjal illetve üledékkal, de toxikus anyagot nem tartalmaz. Ez

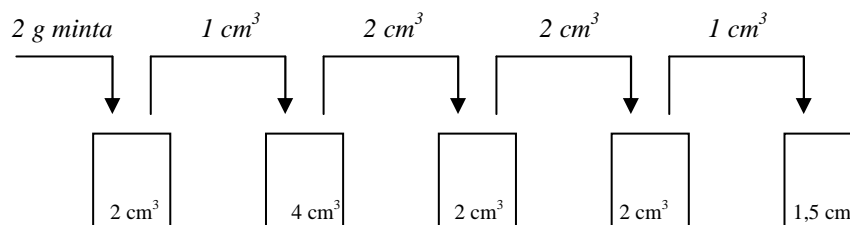
modellkísérletek esetén megvalósítható (pl. talajtisztítási folyamatok modellezése), egyébként csak ritkán áll rendelkezésre szennyezetlen kontroll. Természetesen választható egy biztosan szennyezetlen standard talaj/üledék, esetleg talaj/üledék sorozat, ez azonban ritkán feleltethető meg teljesen a vizsgált talajnak illetve üledéknek.

- Szilárd fázisú minták esetén is problémát okoz, hogy a teszt érzékenysége erősen függ a sejtszuszpenzió által emittált fény intenzitásától. Ezért minden mérésorozathoz egy standard Cu-sor mérése is szükséges, amelynek segítségével a végeredmény Cu-egyenértékben adható meg, így a különböző mérésorozatok eredményei egymással összehasonlíthatók lesznek.

Mintaelőkészítés

A mintákat 105 °C -on súlyállandóságig szárítjuk, majd dörzsmozsárban aprítjuk.

A minták hígítása



18. ábra: Hígítási sor készítése talajmintából lumineszcencia méréshez

A hígítás 2%-os NaCl-oldattal rendszeres keverés mellett történik. A mérés kezdete előtt 30 percig állni hagyjuk a hígítási sor tagjait.

A lumineszcenciagátlás meghatározása luminométerrel

1. A mérőműszer mintatartóiba 0,2-0,2 cm³ inokulumot mérünk.
2. A minta hozzáadása nélkül megmérjük a lumineszcencia intenzitását (I_0).
3. Az inokulumhoz 0,05 cm³-t mérünk a minták felkevert hígításaiból. A standard Cu-sor tagjaiból ugyancsak 0,05 cm³-t mérünk be. A kontroll mintához 0,05 cm³ 2%-os NaCl- oldatot mérünk.

3.a. Ha nem rendelkezünk szennyezetlen kontroll mintával

A minta hozzáadása után azonnal mérjük a lumineszcencia intenzitását (I_1). Az I_1 az adott minta kontrolljaként szolgál, feltételezve azt, hogy a hozzáadás pillanatában a minta még nem fejt ki gátló hatást. Bizonyos esetekben a feltétele-

zés nem helyes, mivel a toxikus anyag pillanatszerűen fejt ki hatását, amit a kiértékeléskor figyelembe kell venni.

3.b. Ha rendelkezünk szennyezetlen kontroll mintával

Az inokulumhoz a vizsgálandó minta hígításai mellé a szennyezetlen kontroll ugyanolyan módon készült hígításait mérjük. Ebben az esetben nincs szükség azonnali mérésre.

4. 30 perces kontakt idő leteltével megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I_{30})

A mérés kiértékelése

Az értékelés a **3.a.** esetben a 16., a **3.b.** esetben a 17. táblázat alapján történik.

16. táblázat: Lumineszcenciagátlás értékelése, szennyezetlen kontroll nélkül

Minta	I_0	I_1	I_{30}	$I_{szám0}=f_0 \cdot I_0$	$I_{szám1}=f_1 \cdot I_1$	$H\% = 100 \cdot (I_{szám1} - I_{30}) / I_{szám0}$
kontroll						
Cu ₁ Cu ₂ Cu ₃ Cu ₄ Cu ₅				Ahol $f_0 =$ $I_{30\text{kontroll}} / I_{0\text{kontroll}}$		
1 minta ₁ 1 minta ₂ 1 minta ₃ 1 minta ₄ 1 minta ₅					Ahol $f =$ $I_{30\text{kontroll}} /$ $I_{1\text{kontroll}}$	

Az EC₂₀ és az EC₅₀ értékek grafikus meghatározása

A kiszámított adatok segítségével egy H% - log bemért anyag (mg szárazanyag) görbét szerkesztünk, amelyről leolvassuk a 20%-os illetve az 50%-os fényintenzitás csökkenéshez tartozó koncentrációértéket. Ezeket EC₂₀ illetve EC₅₀ értéként kezeljük. Cu esetén ugyancsak megszerkesztjük a H%-log (bemért mg Cu) diagramot, és az EC_{20Cu} illetve EC_{50Cu} értékeket leolvassuk.

17. táblázat: Lumineszcencia-gátlás értékelése, szennyezetlen kontroll mintával

Minta	I ₀	I ₃₀	F _{sz_i} *f ₀	Iszám	H%=100*(Iszám-I ₃₀)/Iszám
Kontroll					
Cu ₁ Cu ₂ Cu ₃ Cu ₄ Cu ₅			F ₀ =I _{30k} /I _{0k}	Iszám=f ₀ *I _{0Cu}	
szilárd kontroll ₁ kontroll ₂ kontroll ₃ kontroll ₄ kontroll ₅			Fsz ₁ =I _{30szk1} /I _{0szk1} Fsz ₂ =I _{30szk2} /I _{0szk2} Fsz ₃ =I _{30szk3} /I _{0szk3} . .		
1 minta ₁ 1 minta ₂ 1 minta ₃ 1 minta ₄ 1 minta ₅				Iszám ₁ =fsz ₁ *I _{01m1} Iszám ₂ =fsz ₂ *I _{01m2} . .	

Az összegzett gátlás mértékének kifejezése rézegenértékben (Σ_{Cu})

A végeredmény megadása Cu-egyenértékben történik a következő módon:

$$\Sigma_{Cu} 20\% = 20\text{-os összegzett gátlás} = (EC_{20Cu}/EC_{20minta}) * 10^6$$

$$\Sigma_{Cu} 50\% = 50\text{-os összegzett gátlás} = (EC_{50Cu}/EC_{50minta}) * 10^6$$

A gátlás értéke alapján a következő kategóriákba sorolhatók a minták:

18. táblázat: A toxicitás jellemzése a rézegenérték alapján

Összegzett gátlás 20	Összegzett gátlás 50	Jellemzés
<10	<100	nem toxikus
10-100	100-500	toxikus
>100	>500	nagyon toxikus

4.1.1.2. *Bacillus subtilis* teszt, agardiffúziós módszerrel

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó laboratóriumi, bakteriális, akut toxicitási teszt.

Alkalmassága: pórusvízre, talajkivonatra és egész talajra.

Tesztorganizmus: laboratóriumban könnyen fenntartható, BME-en izolált törzs.

A *Bacillus subtilis* érzékenysége: közepesen érzékeny talajbaktérium, elsősorban toxikus fémekre, mint Zn, Cd, Cu érzékeny.

Végpont: növekedés-gátlás, kioltási zóna formájában, hígítási sor kioltási zónáiból EC₅₀.

Kiértékelés: vizuális

Tesztelés időtartama: 48-72 óra

A tesztek szabványosított formái: BME-MGKT-n kidolgozott módszer, nincs szabványosítva.

Megjegyzés: nagyszámú minta szűrővizsgálatára kifejlesztett agardiffúziós módszer.

A *Bacillus subtilis* teszt kifejlesztése a Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszéken történt. A Gyöngyösorosziban található Pb-Zn bánya okozta környezeti károk felmérésére fejlesztettük ki ezt a laboratóriumi ökotoxikológiai tesztet. A korábban izolált és törzsgyűjteményünkben tárolt nehézfémérzékeny törzseket a Gyöngyösoroszi meddőhányóról származó, a vizsgált területre jellemző toxikus fémtartalmú hulladéokra való érzékenység szerint szelektáltuk. A legérzékenyebbek talált *Bacillus subtilis* GYK jelű törzset használtuk tesztorganizmusként a Gyöngyösorosziban végzett előzetes szűrővizsgálatoknál.

A méréshez a szakirodalomból ismert agardiffúziós eljárást alkalmaztuk, azzal a módosítással, hogy a mintát nem a tápagarból kivágott lyukba mértük, ahogy ez általában szokásos, hanem a mintából agar-aggal szilárdított mintakorongot készítettünk és ezt helyeztük a mikrobát tartalmazó tápagar felületére. 1g szárított és porított mintát homogenizáltunk 2 cm³ megolvasztott agar-agarban. Megszilárdulás után 13 mm-es dugófúróval vágtuk ki a mintakorongot.

A minták vizsgálatára 30*30 cm-es üvegtálcát készítettünk, ebbe öntöttük a 120 cm³ *Bacillus subtilis* tartalmazó tápagart. Az egyenletes tápagar vastagság érdekében vigyáznunk kellett, hogy a tápagar megszilárdulása teljesen vízszintes felületen történjen. Az agar megszilárdulása után a mintakorongokat meghatározott sorrendben a tápagar felületére helyeztük.

A módszer lényege, hogy az agaros táptalajban egyenletesen elosztatott és lemezkiént kiöntött *Bacillus subtilis* szaporodását a lemez felületére helyezett mintakorong, toxicitásától függően gátolja. A mintakorong körül kialakult kisebb denzitású - gátlási vagy gyengítési - zóna megjelenéséből következtethetünk a toxicitásra. A kialakult zóna átmérője a mintában lévő szennyezőanyag koncentrációjának valamint az agarban való mozgékonyságának, diffúziós tulajdonságának függvénye.

Oldatban lévő standard sorok esetén az tapasztalható, hogy a kisebb denzitású zóna átmérője arányos a szennyezőanyag koncentrációjával, így a zóna átmérőjéből következtethetünk a szennyezőanyag mennyiségére (Gruiz, 1994). Talajminták esetén természetesen a helyzet bonyolultabb, hiszen nem egyedülálló szennyezőanyaggal állunk szemben, hanem vegyi anyagok keverékével, amelyek agarban jellemző viselkedését a talajalkotók maguk is jelentősen megváltoztathatják. Másrészt, a szennyezőanyagok a legkülönbözőbb kémiai formában lehetnek jelen, amelyeknek oldhatósága és diffúziója igen eltérő. Ezért szilárdfázisú minták esetén a kisebb denzitású zóna átmérője és a minta toxicitása közötti viszonyról kvantitatív következtetéseket csak nagy körültekintéssel lehet levonni. Így teljes talajminták esetén, a módszer kvalitatív természetű (toxikus, nem toxikus) eredményeket szolgáltat. Elővizsgálatra, a negatív minták kiszűrésére alkalmas, gyors ökotoxikológiai teszt. Egy nap alatt akár 500 minta vizsgálata is elvégezhető.

Inokulumkészítés módja

A *Bacillus subtilis* törzset 24 órán át, 28 °C-on, rázatás közben szaporítjuk 20 cm³ húslé tápoldatban, amelynek összetétele, 1000 cm³ desztillált vízre megadva, a következő:

5g	pepton
5g	glükóz
3g	húskivonat
0,5g	NaCl
pH	7,0

Sterilizés autoklávban 121 °C-on, 10 percig.

Az agardiffúziós teszt kivitelezése, az alapagarlemez és a mintakorong készítése

A kísérleteket 30*30 cm-es steril üvegtálcában végezzük, amelybe 250 cm³ 50 °C-os húslé agarhoz kevert 20 cm³ inokulumot öntünk. A tálcába öntött tápagaros sejtuszpenziót vízszintes felületen hagyjuk kihűlni, így a tápagar mindenütt azonos vastagságúra szilárdult.

Az érzékenységi vizsgálatokhoz a mintakorong készítése a következők szerint történik: 3,5 cm átmérőjű edénykébe 0,2 cm³ standard oldatot és 2 cm³ megolvasztott vizes agar keverékét öntünk, majd megszilárdulás után 13 mm átmérőjű dugófüróval vágjuk ki a mintakorongot. Talajminták esetén 2 cm³ megolvasztott vizes agar-agarhoz 1 g talajt keverünk, megszilárdulás után hasonlóan járunk el, mint a standard oldatok készítése esetén.

A *Bacillus subtilis* teszt kiértékelésének módja

A szennyezőanyag a mintakorongból az agarlemezbe diffundál és toxicitásától függő mértékben gátolja a mikroba szaporodását. A jelenséget a mintakorong körül kialakult, eltérő (kisebb) denzitású zónával jellemezhetjük. A kisebb denzitású zónát (ebben az esetben a mintakorong körül kisebb a mikroba-koncentráció) **gátlási zó-**

nának nevezzük. Kétféle gátlási gyűrűt vagy zónát különböztetünk meg: a *kioltást*, amikor egyáltalán nincs szaporodás a gyűrűn belül (áttetsző az agar) és a *gyengítést*, amikor szaporodás van, de mértéke csökkent. Serkentő hatású anyagok **serkentési zóna** kialakulását eredményezik a mintakorong körül, ami a nagyobb denzitás alapján észlelhető. Semleges minták a mintakorong körül nem eredményeznek gyűrűképződést.

A mintakorongokat hordozó agarlemezeket 30 °C-on inkubáljuk, 24 óra elteltével értékeljük a kísérleteket. Az értékeléskor a mintakorong körül kialakult zónát méretével és jellegével (gátlási, serkentési) jellemezzük. Gyengítési zóna gyakran több gyűrűre osztható, értékeléshez mindig a legkülső gyűrű átmérőjét használjuk. A minták a következő négy csoportba sorolhatók:

kioltási zóna	<i>erős gátlás</i>	toxikus minta
gyengítési zóna	<i>gyenge gátlás</i>	gyengén toxikus minta
nincs zóna	<i>nincs gátlás</i>	nem toxikus a minta
serkentési zóna	<i>serkentő hatás</i>	nem toxikus a minta

Érzékenységi vizsgálatoknál a zóna átmérőjét is mérjük, felhasználjuk a kiértékeléshez. Talajmintáknál az eredményeket általában csak annak eldöntésére használjuk, hogy toxikus vagy nem toxikus a minta.

4.1.1.3. *Azotobacter agile* tesztorganizmus dehidrogenáz aktivitása

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, bakteriális, akut toxicitási teszt.

Alkalmassága: pórusvízre, talajkivonatra és egész talaj vizes szuszpenziójára.

Tesztorganizmus: *Azotobacter agile*: laboratóriumban könnyen fenntartható baktériumfaj, a veszélyes hulladékok vizsgálatára szóló magyar szabványokhoz az OKI-ban fenntartott törzs.

Az *Azotobacter agile* érzékenysége: a szennyezőanyagok széles skálájára érzékeny tesztorganizmus. Túlságosan is érzékeny, így a teszt során, a szennyezőanyag toxicitásán kívüli okok is okozhatnak gátlást. Screenelésre, a negatív minták kiszűrésére javasolható.

Végpont: dehidrogenáz aktivitás megléte vagy hiánya, illetve csökkenése a hígítással: EC₅₀.

Szükséges műszer: vizuális (alternatív elektronakceptor színének megjelenése: igen, nem), vagy fotométer (alternatív elektronakceptor színintenzitása).

Tesztelés időtartama: 48 óra

Szabványosított módszerek: MSZ 21978/30

Talajra adaptált, direkt kontaktra illetve talajszuszpenzióra kidolgozott változatát a BME-MGKT-n fejlesztettük ki.

Megjegyzés: A szabvány nem talajra, hanem veszélyes hulladékok oldatára illetve kivonatára vonatkozik.

Módszer

Az *Azotobacter agile* tesztorganizmus dehidrogenáz enzimaktivitását mérjük. Ha valamilyen környezeti stressz éri a sejtet, akkor az elektrontranszport rendszer megsérülhet. Ezt a jelenséget használják ki a dehidrogenáz aktivitást mérő ökotoxikológiai tesztek. Az elektrontranszport lánc első szakaszának lépéseit a dehidrogenáz enzim katalizálja. Alternatív elektronakceptorként TTC (2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid) szolgál, mely az elektrontranszportlánc zavartalan működése esetén redukálódik, és piros színű trifenil-formazánná alakul. A piros szín megjelenése mikrobiális tevékenységre utal. Toxikus anyagok jelenlétében a dehidrogenáz enzimaktivitás gátolt, ezért a TTC redukciója nem történik meg, vagyis a piros szín nem jelenik meg, vagy intenzitása kisebb, mint a szennyezetlen kontrollé.

Mintánként 2 g talajt egy órán keresztül, áramló gőzben sterilizálunk. A bemérést steril körülmények között, steril átotófülkében ajánlott végezni, mert ha más mikroorganizmusok kerülnek a tesztoldatba, azok dehidrogenáz aktivitása megzavarhatja az eredményt. Idegen mikroorganizmusok gátolhatják is az *Azotobacter agile*-t. A méréshez legalább öttagú, kétszeres léptékű hígítási sort készítünk: 0,5 g, 0,25 g, 0,125 g, 0,0625 g és 0,0312 g bemért mennyiségekkel.

A 48 órán keresztül, 25 °C-on rázatott baktériumszuszenzióból 5 cm³-hez 100 cm³ sterilizált Fjodorov táptalajt és 1 cm³ TTC oldatot adunk. Az elkészített keverékből a kémcsövekbe 2-2 cm³-t pipettázunk, homogenizáljuk (Vortex segítségével), lezárjuk, majd 25 °C-os termosztátba tesszük.

Referenciaként réz hígítási sorozatot használunk tízszeres hígítási faktorial, azaz 400, 40, 4, 0,4 és 0,04 ppm koncentrációjú oldatokkal. Az értékelés 72 óra múlva végezhető.

4.1.2. Protozoa tesztek

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, akut toxicitási teszt.

Alkalmas: pórusvízre, talajkivonatra és talaj szuszpenziójára.

Tesztorganizmus: *Tetrahymena pyriformis*, *Colpoda steinii* állati egysejtű.

Végpont: szaporodás, ill. pusztulás: az állatok száma.

Szükséges műszer: mikroszkóp vagy elektromos részecskeszámláló.

Tesztelés időtartama: 48 óra.

A teszt szabványosított formája: nincs

Talajra adaptált és direkt kontaktra kidolgozott változat: BME-MGKT

Megjegyzés: az állati egysejtűekkel való munka viszonylag egyszerű és gyors, az eredmény a környezeti kockázatfelmérésben igen fontos trofikus szintet (állat) képvisel.

4.1.2.1. Toxicitás vizsgálat *Colpoda steinii* tesztorganizmussal

A *Colpoda steinii* egy talajban élő csillós protozoa. A protozoák nem rendelkeznek sejtfallal, ezért a toxikus anyagok könnyen bejuthatnak a sejtjeikbe, ezzel pusztulásukat okozva. A protozoák vizes közegben élnek és táplálkoznak, így a vizes közegű tesztoldatokban lévő toxikus anyag a táplálékkal együtt kerül be a protozoa sejtjébe.

A tesztelés során a *Colpoda steinii* növekedésgátlását vizsgáljuk.

Inokulumkészítés

A *Colpoda steinii* szaporítása egy növekedésben lévő *Pseudomonas fluorescens* baktériumtenyészetben történik. A *Pseudomonas fluorescens* tenyészetet 25 °C -on 48 órán át szaporítjuk **E** tápoldatban.(1). A *Colpoda steinii* szaporítása az (1) tápoldatban történik, 25 °C -on 48 órán át (2)

A vizsgálatához használt táptalajok és oldatok:

E tápoldat

NaCl	0,1g	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2g
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	1,36g	Mikroelem oldat	3 ml
KH ₂ PO ₄	0,75g	Élesztőkivonat	1g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,033g	Glükóz	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25g	Ioncserélt víz	1000ml

Mikroelem oldat

EDTA	5g	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,161g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2,2g	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,157
MnSO ₄ *4H ₂ O	0,57g	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,15g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,5g	Ioncserélt víz	1000ml

Állítsuk be a pH-t 6-ra 40 %-os KOH -val.

NB tápoldat (Nutrient Broth)

"Lab Lemco" por	1g	Pepton	5g
Élesztő kivonat	2g	NaCl	5g
Ioncserélt víz	1000ml		

P+J oldat

Az „A”, a „B” és a „C” oldatok mindegyikéből 1-1 ml-t 997 ml ioncserélt vízzel 1000 ml-re egészítünk ki.

„A” oldat:	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,433g
	KCl	0,162g
„B” oldat:	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0,648g
„C” oldat:	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,28g

Malachitzöld oldat

1 %-os malachitzöld vizes oldat.

Lugol oldat

5 %-os jód és 10 %-os kálium - jodát.

Az ökotoxikológiai teszteléshez szükséges inokulumok

A *Pseudomonas fluorescens*-t 1:10 hígítású NB tápoldatban 25 °C -on 24 órán át levegőztetve szaporítjuk (3). A *Colpoda steinii*-t 25 °C -on 24 órán át tenyésztjük (3)-ban, levegőztetés mellett (4). Párhuzamosan a *Pseudomonas fluorescens* 50 ml NB-ben 25 °C -on 24 órán át szaporítjuk (5).

A vizsgálat menete

Az (5) tenyészet sejtjeit centrifugáljuk 3600 rpm-en 10 percig, 50 ml-es centrifugacsöveket használva. A sejteket kétszer mossuk P+J oldattal és 10 ml-el szuszpendáljuk fel. A P+J oldat tejszerűvé teszi a sejtszuszpenziót (6).

A teszteléshez használandó *Colpoda* sejtek denzitásának ellenőrzése a (4) szuszpenzióban történik. A (4)-ből kivett, ismert mennyiségű sejtszuszpenziót Lugol-oldattal rögzítjük (1 csepp ml-enként), megfestjük malachitzölddel (1 csepp ml-enként) és végül mikroszkóp alatt Bürker kamrában megszámláljuk a *Colpoda* sejteket.

A mérés kivitelezése

A tesztcsövekbe mérünk:

1. 50 µl *Pseudomonas* szuszpenziót (6)
2. 50 µl *Colpoda* szuszpenziót (4)
3. 900 µl tesztelendő vagy kontroll mintát

Inkubálás: a kémcsöveket 25 °C -on 24 órán át tartjuk az inkubátor-szobában vagy termosztátban. Ahhoz, hogy elkerüljük a minták benedvesedését vagy befertőződését steril, fedhető kémcsöveket alkalmazunk.

Rögzítés és számlálás, a mérés kiértékelése

24 óra után 1 csepp Lugol oldatot és 1 csepp malachitzöld oldatot adunk minden egyes mintához. A mintákat Bürker kamrában számláljuk. A pipettázás előtt a mintákat jól felrázzuk, a számlálókamrát pedig fedőlemezzel fedjük le és mikroszkóp alatt számláljuk a sejteket. A *Colpoda steinii* a toxikus anyag hatására inaktívvá válhat és sejtsoportosulást hozhat létre. Ez megnehezíti a mikroszkóp alatt történő számlálást.

Számlálás részecskeszámlálóval

A sejtek számának megállapítására elektronikus sejt számlálót is lehet alkalmazni. LABORSCALE (PSL-1) - ANALISATOR (PSA-1) részecskeszám- és részecskenagyság-elemző készülékkel (Medicor Művek) végezhetjük a mérést.

A *Colpoda steinii* inaktív formában hajlamos összecsapódní, a sejtsoportosulás megszüntetésére ultrahangos dezintegrátoros kezelést alkalmazunk 10 másodpercig.

A sejt számláláshoz használt mérőkapilláris: 200 μm . A mérőáram 400 μA .

Minimum három párhuzamos mérést kell végezni. Akkor kezdhetjük a mérést, amikor a háttér 0 értéket mutat.

4.1.2.2. Toxicitás vizsgálat *Tetrahymena pyriformis* tesztorganizmussal

A *Tetrahymena pyriformis* egy vízben élő csillós protozoa. Mivel vizes közegben él, ezért vizes közegű tesztekhez alkalmazható. A protozoa vizes közegből veszi fel a táplálékát, ezért a vízben oldható szennyezőanyagok közvetlenül hatnak a szaporodási ciklusára.

A mérés elve a protozoa szennyezőanyag hatására bekövetkező növekedés gátlása. A teszt 48 óra elteltével értékelhető, tehát magasabbrendű állati tesztekhez képest gyors és reprodukálható választ ad.

Inokulum készítés

A vizsgálatához használt sejtuszpenzió elkészítése két lépésben történik. Először az úgynevezett PP tápoldat 50 ml-ébe oltunk 2 ml sejtuszpenziót. Amikor az ilyen módon beoltott sejtuszpenzió 16 órás, alkalmas a bioteszt indítására.

A sejtuszpenziót 28 °C -on rázatás nélkül sötét helyen tenyésztjük.

Az inokulumkészítéshez használt tápoldatok:

Tetrahymena fenntartása az un. PP tápoldatban történik:

proteáz pepton	5 g
élesztőkivonat	1 g
glükóz	5 g

TRIS-HCl	1,2114 g
Sóoldat 1	10 ml
Sóoldat 2	10 ml
desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve

Sóoldat 1 összetétele:

CaCl ₂ *2H ₂ O	0,5 g
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃ *6 H ₂ O	0,0125 g
desztillált víz	100 ml

Sóoldat 2 összetétele:

MgSO ₄ *7H ₂ O	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ *6H ₂ O	0,25 g
MnCl ₂ *6H ₂ O	0,005 g
ZnCl ₂	0,0005 g
desztillált víz	100 ml
Sterilizálás autoklávban 121 °C –on, 10 percig.	

A mérés kivitelezése

A 16 órás inokulumból 5 ml -t teszünk egy kémcsőbe. Ehhez adunk 5 ml PP tápoldatot és 500 µl-t a tesztelendő oldatból. Ez után a mintákat 28 °C-os sötét helyen inkubáljuk.

A teszt kiértékelése mikroszkópos számlálással

A mintákat 48 óra inkubálás után kivesszük a 28 °C-os termosztátból és a kémcsövek felső rétegéből mintát veszünk. A mintát 1%-os formaldehid oldattal rögzítjük és Bürker-kamrában számláljuk. A kísérleti eredményeket kontrollhoz viszonyítottuk, ami vizes oldatok esetében 500 µl desztillált víz, a talajminták esetében szennyezetlen kontroll talaj.

A Bürker-kamrás számlálással kapott értékeket a kamra beosztásától függően a térfogatukhoz tartozó értékkel szorozzuk, hogy a mintában található sejtszámot db/ml-ben kaphassuk meg. A gátlási százalékot a kontrollhoz viszonyítva adjuk meg.

Sejtszámlálás részecskeszámlálóval

Az értékeléshez elektronikus sejtszámlálót is alkalmazhatunk. A használt berendezés: LABORSCALE (PSL-1) - ANALISATOR (PSA-1) részecskeszám és részecskenagyság elemző készülék (Medicor Művek). Ultrahangos kezelést ebben az esetben nem használunk, mert bár a *Tetrahymena pyriformis* is csoportosult kis mértékben, de az ultrahangos kezelés hatására a sejtek jelentős mértékben pusztulnak.

A sejtszámláláshoz 200 µm-es mérőkapillárist használunk. A mérőáram 800 µA. Minimum három párhuzamos mérést végzünk, 0-ra állított háttérérték mellett.

4.1.3. Növényi ökotoxikológiai tesztek

A növényi tesztorganizmusok közül a fehérmustárra és a kerti zsászára kidolgozott módszereket ismertetjük. Hasonló módon más növényekkel is lehet tesztelést folytatni, ha a növény leget tesz a laboratóriumi munka követelményeinek.

A növényekkel végzett tesztek során egyazon kísérletben mérhetjük a csírázóképeség gátlását, valamint a gyökér- és szárnövekedés-gátlást. Ha a biomassa mennyisége vagy a bioakkumuláció a végpont, akkor nagyobb méretű tenyészedényes kísérletekre van szükség.

4.1.3.1. Fehér mustár csírázásgátlás, gyökér-, és szárnövekedési teszt

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, növényi, akut toxicitási teszt.

Alkalmassága: pórusvízre, talajkivonatra és teljes talaj vizes szuszpenziójára.

Tesztorganizmus: fehér mustár (*Sinapis alba*): A magok vetőmagboltban beszerezhető.

A *Sinapis alba* érzékenysége: a szennyezőanyagok széles skálájára érzékeny.

Végpont: csírázásgátlás a kontroll minta százalékában, szár és gyökérnövekedés gátlás a kontroll százalékában megadva, vagy ED20 és ED50 a minták hígítási sorozatából.

Szükséges műszer: műszer nem szükséges, csak vonalzó, a kiértékelés vizuális.

Tesztelés időtartama: 72 óra.

Szabványosított módszerek: MSZ 21976-88

Teljes talajra adaptált, direkt érintkezésre is kidolgozott változat: BME-MGKT.

Módszer

A teszt kivitelezésére vonatkozólag irányadónak az MSZ 21976-17/1988 szabványt vesszük. Ez a szabvány szilárd fázisú minták vizes kivonataira vonatkozik, azonban mi a talajmintákat nem kivonat, hanem szilárd fázis formájában teszteljük.

A vizsgálatok során a magok csírázására, gyökér- és szárnövekedésre gyakorolt hatást tanulmányozzuk a különböző talajokban, OECD kontroll talajhoz viszonyítva. Előzetesen meghatározzuk valamennyi légszáraz minta nedvességtartalmát.

Anyagok

Tápsóoldat 1 dm³ ionmentes vízben:

0,6 g	KH ₂ PO ₄	0,13 g	MgCl ₂ *H ₂ O
1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,001 g	CaCl ₂ *2H ₂ O
0,14 g	Na ₂ SO ₄	0,5 g	KNO ₃
0,5 g	NaCl		
1 cm ³	mikroelem oldat (Pfennig 1965-ös oldat)		

Mikroelem oldat összetétele:

1 g	AlCl ₃	0,5 g	Na ₂ MoO ₄
0,5 g	KI	0,1 g	Na VO ₃ *H ₂ O
0,5	KBr	0,5 g	szelénsó
0,5 g	LiCl	0,5 g	Ba Cl ₂
7,0 g	MnCl*4H ₂ O	0,05 g	SnCl*2H ₂ O
11 g	H ₃ BO ₃	1 g	ZnCl ₂
1 g	CuCl ₂	1 g	NiCl ₂
5 g	CoCl ₂		
3600 cm ³	deszillált vízben oldva		

OECD kontroll talaj:

tőzeg (10-12 % nedvességtartalmú)	10%
agyag (légszáraz, 30 %-nál kisebb kaolinit tartalommal)	20 %
kvarchomok (légszáraz, kb. 0,05-0,2 mm-es szemcseméret)	68-69 %

A talajminták általában légszáraz állapotban kerülnek tesztelésre. A talajok víztartalmát minőségüktől függően eltérő vízmennyiséggel egyensúlyi nedvességtartalmúra kell állítani.

A tesztnövény mustármag (*Sinapis alba*) vetőmagboltból származó, friss mag, melynek csírázóképesége minimum 95 % kell legyen.

A vizsgálat menete

A vizsgálandó talajokból 0, 2, 4, 8-szoros hígításokat készítünk, ezekből a hígításokból 4,5 g-ot egyenletesen szétterítünk a steril Petri-csésze felületén, majd szűrőpapírral lefedjük. Ezt követően a Petri-csészékbe 5 cm³ steril vizet mérünk úgy, hogy a benedvesített szűrőpapír alatt légbuborék ne maradjon. Hasonlóan készítjük el a kontroll talajt is (OECD).

Minden benedvesített szűrőpapírra 20 db mustármagot helyezünk szabályos elrendezésben. Az így elkészített mintákat 24 órára illetve 72 órára, 20 °C-on sötét helyiségben tartjuk.

24 óra elteltével meghatározzuk a kicsírázott magok számát, amit a kontroll mintához hasonlítunk. 72 óra elteltével mérjük a gyökér és a szár hosszát.

Direkt érintkezést a talaj és a növény gyökere között úgy létesítünk, hogy nem teszünk szűrőpapírt a talaj felületére. Ilyenkor a gyökerek bensőségebb kölcsönhatásba kerülnek a talajjal. Emiatt a gyökérhossz nem mindig mérhető, mert a gyökér nem távolítható el sérülés nélkül a talajból.

Az eredmény megadása

Megadjuk a gyökér- és szárnövekedés-gátlását %-ban, az egyes hígításokra vonatkozóan. A hígításból kapott gátlási %-ok értékeit grafikusán ábrázoljuk a bemért talajminta függvényében és ebből leolvassuk a 20 %- illetve 50 %-os gátlásnak megfelelő talajmennyiségeket (dózisokat): ED20, ED50, A gyökér- és szárnövekedés-gátlását a kontrollközegben kicsírázott magvak gyökérének hosszúságához viszonyítva, százalékban adjuk meg, hígításonként a következő összefüggéssel

$$X = (K - M / K) * 100$$

X: gyökernövekedés, % ill. szárnövekedés %

K: kontroll magvak gyökérhossza, ill. szárhossza, mm

M: a kezelt magvak gyökérhossza ill. szárhossza, mm

A gyökernövekedést befolyásoló egyéb tényezők

A gyökérhossz nem minden esetben arányos a gátló hatással. A gyökér a szennyezett talaj, a talaj heterogén eloszlású szennyezőanyagainak elkerülésére gyakran a gyökerek abnormális megnyúlásával reagál. Ezt a fajta „gyökernövekedést” vizuálisan meg lehet különböztetni a valódi gyökernövekedéstől, mert a kényszerűségből meghosszabbodott gyökerek vékonyabbak. Emiatt a gyökérhossz, illetve a gyökernövekedés mint végpont korlátozottan alkalmazható szénhidrogénekkal és más hidrofób szennyezőanyagokkal szennyezett talajok esetében.

4.1.3.2. Kerti zsásza szár- és gyökernövekedés-gátlási teszt

A kerti zsásza teszt (*Lepidum sativum*) kidolgozásánál Sellner vizsgálati módszerét (Sellner, 1993) vettük irányadónak. A módszer szilárd fázisú minták kivonataira vonatkozik, azonban mi a talajmintákat nem kivonat, hanem szilárd fázis formájában teszteljük. A biomasszanövekedés-gátlás, a gyökernövekedés- ill. szárnövekedés-gátlás a csíramag tulajdonságát jelző, mérhető és számítható százalékos érték, amely kifejezi a mérgező anyag(ok)nak a csíramagra a biomasszára, a gyökér- ill. szárnövekedésre gyakorolt hatását a negatív kontrollhoz viszonyítva.

Közvetlenül a talajokra helyezve vizsgáljuk a kerti zsásza (*Lepidum sativum*) biomassza-, gyökérhossz- és szárhossznövekedését. Kontrollként OECD talajt használunk. A vizsgálathoz a mintákat előzetesen szobahőmérsékleten szárítjuk, majd homogenizáljuk.

A vizsgálat menete

Minden szennyezett talajmintából hígítási sort készítünk kontroll talajjal Petri-csészékben. A szennyezett talajokból bemért mennyiségek: 5 g, 2,5 g, 1,25 g, 0,62 g,

0,31 g. Ezután a szennyezett talajokból bemért mennyiségeket 5 g-ra egészítjük ki a kontroll talajjal, majd minden mintához annyi vizet adunk, hogy az megfeleljen az egyensúlyi telített nedvességtartalomnak. A talajok homogenizálása után a Petri-csészékbe 20-20 zsáksamagot teszünk egyenletes elrendezésben. Az így előkészített mintákat 20°C-on sötét szobában tartjuk, és 7 nap elteltével mérjük a kifejlődött növények nyers tömegét (biomassza), valamint szár- és gyökérhosszát.

Az eredmény megadása

A szár- és gyökérhossz értékekből határozzuk meg a kontrollra vonatkoztatott biomasszanövekedés-gátlást, valamint a szár és gyökérnövekedés-gátlást (X_m , X_{sz} , X_{gy}) %-ban kifejezve az egyes hígításokra vonatkozóan.

$$X_m = 100 \cdot (m_k - m) / m_k \quad X_{sz} = 100 \cdot (L_{ksz} - L_{sz}) / L_{ksz} \quad X_{gy} = 100 \cdot (L_{kgy} - L_{gy}) / L_{kgy}$$

X_m , X_{sz} , X_{gy} - a szár- és gyökérnövekedés-gátlás %-ban kifejezett értéke
 m - a vizsgált talajokon a növények nyers tömege
 m_k - a kontroll talajon nőtt növények nyers tömege
 L_{sz} , L_{gy} - a vizsgált talajokon a növények szár- és gyökérhossza
 L_{ksz} , L_{kgy} - a kontroll talajon nőtt növények szár- és gyökérhossza

A gátlási % értékeket a megfelelő, bemért mennyiség függvényében ábrázoljuk, majd a pontokra illesztett görbéről leolvassuk a 20 %-os és 50 %-os gátlásnak megfelelő talajmennyiségeket (dózisokat), az ED₂₀ és ED₅₀ értékeket.

4.1.4. Collembola (*Folsomia candida*) teszt

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, állati, akut toxicitási és krónikus (reproduktivitási) teszt. Mikrokozmosz tesztként is alkalmazható.

Alkalmassága: a teljes talaj közvetlenül, a talajkivonat standard talajra itatva vizsgálható.

Tesztorganizmus: *Folsomia candida*, ugróvillás *Collembola*.

A *Folsomia candida* érzékenysége: nehézfémekre kevésbé, szerves szennyezőanyagokra érzékeny, főleg az illékonyakra és a bőrön át felszívódókra.

Végpont: állatok száma: letalitás, hígításból EC 20 és EC 50, reprodukivitási teszt alapján NOEC.

Szükséges műszer: citoplaszt mikroszkóp vagy vizuális.

Tesztelés időtartama: akut: 5-10 nap, reprodukció: 20 nap.

Szabványosított formában: ISO/TC 190 SC4, WG2 ISO, Riepert és Kula, 1996.

Megjegyzés: jól reprodukálható, könnyen kivitelezhető teszt.

Módszer

A *Folsomia candida* faj a *Collembolák* (ugróvillások) rendjébe tartozik, ősi rovar. Apró (max. 3-4 mm hosszú) fehér állatkák, a hasi oldalukon ugróvillájuk van, amit ha hátracsapnak felpattannak a levegőbe. A talajban élnek, erdőben előfordulhat, hogy m²-enként 100 000 található belőlük. Hasi tömlővel lélegeznek, emiatt a talajgőzökre érzékenyen reagálnak.

A *Collembolák* epimorfózissal (kifejléssel) szaporodnak. Ha nagyon alacsony a nedvességtartalom, a peték kiszáradnak. Megfelelő nedvességtartalmú, 20°C-os környezetben a peték 10 - 15 nap alatt kelnek ki, a kikelt állatok újabb 10 - 15 nap alatt válnak ivaréretté.

A faj akut és krónikus teszthez is használható, az *akut teszt* két hétig tart, ami azt veszi figyelembe, hogy hány százalékban maradnak meg az állatok a vizsgált mintán. Ezzel a teszttel lehet a minta hígításából az EC₂₀-at és EC₅₀-et (a 20 és az 50%-os pusztulást okozó koncentrációt vagy dózist (ED₂₀ és ED₅₀) meghatározni. A másik a négy hétig tartó *krónikus teszt*. Ez a teszt tulajdonképpen egy reprodukció vizsgálat, mivel a megmaradt állatok száma mellett figyelembe veszi azt is, hogy milyen mértékben szaporodtak.

Az állatok labor körülmények között gipszből és aktív szénből készített mesterséges aljzaton tarthatóak életben. A mesterséges aljzathoz egy 12,5*9*4,5 cm-es műanyag edénybe 40 g gipszet és 5 g aktív szénport kell bemérni, és gondosan összekeverni. Majd 45 ml vizet kell hozzákeverni, ügyelve, hogy a keletkező felület sima legyen, majd vízszintes helyen állni hagyni míg a gipsz megköt, és visszahül szobahőmérsékletre. (Az aljzat készítésénél azért szükséges a gipszhez aktív szenet adni, mert így jól látszanak rajta a fehér állatok.)

A Collembolák természetes környezetükben szerves törmelékeket, gombahifákat esznek, ami labor körülmények között a gipszlap felszínére szórt szárított sütőélesztővel helyettesítő.

A vizsgálathoz azonos korú (14 napos) állatkákat kell felhasználni, ezért szükséges a szinkron populáció létrehozása. Ehhez egy a fenti módon elkészített, megnedvesített gipszlapra 50 db állatot kell helyezni, amelyek 2-3 napon belül lepetéznek. A peték kb. 2 hét (10-12 nap) múlva kelnek ki (ilyenkor egész apró állatkák is megfigyelhetők, ekkor távolítandók el az idősebbek a lapról). Az állatok sérülésmentes áthelyezéséhez egy speciális, saját fejlesztésű edénykét használunk.

Az átrakó edényke alapja egy csapda, amely egy 3 cm átmérőjű, 7 cm magas műanyag gyógyszeres doboz, melynek tetején két lyuk van, és ezekben egy-egy szilikongumi cső helyezkedik el. A két cső átmérője nem azonos, az egyik belső átmérője 2 mm, a másiké 3 mm. Erre a különbségre azért van szükség, mert két 3 mm belső átmérőjű cső esetén az állatok olyan lendülettel érkeznek az edény aljára, hogy egy részük nem marad életben, és ez a tesztet meghamisítaná. A különböző átmérőjű csövek lényege, hogy a nagyobb átmérőjű csőben lecsökken az áramlási sebesség, így az ütközés erejét már minden állatka elviseli.

Az átrakó csövei közül a nagyobb belső átmérőjű a hosszabb, hogy a mesterséges aljzatot tartalmazó doboz mellé leállítva annak minden pontját el lehessen vele érni, valamint ez nyúlik mélyebben az edénybe, hogy az átrakóba juttatott állatok azt a légárammal el ne hagyják.

Az akut vizsgálat kivitelezése

1. A teszthez 20-20 g légszáraz talaj- vagy üledékmintát mérünk be 370 ml-es befőttes üvegekbe
2. A mintákat 5-5 ml vízzel megnedvesítjük és 2-2 mg élesztőt szórunk a tejtükre
3. Az üvegekbe 10-10 db állatkát juttatunk a fent leírt átrakóval
4. A teszt edényeket 7 napig sötét, 20-25°C-os helyen tartjuk, majd kiértékeljük

ED₂₀ és ED₅₀ meghatározása céljából, a mintákból hígítási sort készítünk. A hígításhoz valamint kontrollként OECD standard talajt használunk.

Az OECD talaj mindhárom komponensének összemérésakor légszáraznak kell lennie.

Az OECD talaj összetétele:

Összetevő	Mennyiség, %
Tőzeg	10
Kaolinit agyag (min. 30% kaolinit tartalom)	20
Ipari kvarc homok	70

A mintáknál alkalmazandó hígítási sor

Minta, g	20	10	5	2,5	1,25
OECD, g	0	10	15	17,5	18,75
Tömegarány	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

Az akut vizsgálat kiértékelése

1. A teszt edényekben levő talajt vízzel felfuszpendáljuk
2. Az edényben a talajt óvatosan megkeverjük, hogy az egyben maradt rögök szétszessenek, és az állatkák feljuthassanak a víz felszínre.
3. A felszínen úszkáló állatkákat megszámoljuk.
4. A megmaradt illetve elpusztult állatkák számából következtetünk a vizsgált minta toxicitására.

A hígítási sorból kapott értékeket (megmaradt állatok darabszáma) a hígítás tömegarányának függvényében ábrázoljuk (20 g minta \geq 1). A kapott pontokra görbét illesztünk, aminek alapján meghatározható a 20 és az 50%-os pusztuláshoz tartozó tömegarány (EC₂₀ és EC₅₀).

4.1.5. Földgiliszta (*Eisenia fetida*) teszt

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, állati, akut vagy krónikus ökotoxikológiai teszt. Lehet toxicitási teszt letalitás végponttal, vagy bioakkumulációs teszt az állatok kémiai vizsgálata alapján. Mikrokozmosz tesztként is alkalmazható akár több fajú ökotoxikológiai, akár integrált fizikai-kémiai-biológiai jellemzésre.

Alkalmassága: egész talajra és talajkivonatra. Utóbbit referencia talajhoz kell keverni.

Tesztorganizmus: *Eisenia fetida*, földgiliszta.

Az *Eisenia fetida* érzékenysége: közepesen érzékeny tesztorganizmus. Az expozíciós útvonalak közül a bőrkontakt és az emésztés dominál. Akut hatásokkal szemben ellenállóbb, a krónikus toxicitás és a reprodukтивitás nagyobb érzékenységet biztosít.

Végpontok:

- akut és krónikus toxicitás esetében: az állatok száma, letalitás, hígítással EC 20 és/vagy EC 50, valamint NOEC,
- reprodukтивitásnál: az utódok száma, NOEC,
- bioakkumuláció vizsgálata esetén: koncentráció a szövetekben.

Szükséges műszer: akut tesztnél: állatok száma: manuális és vizuális, bioakkumuláció vizsgálata esetén: a szennyezőanyagoknak megfelelő analitikai műszer.

Időigény: szűrőpapír teszt (OECD, 1984) esetén 24 és 48 óra, mesterséges talajteszt (OECD, 1984; EEC, 1982) esetén 7 és 14 nap.

Szabványosított módszerek: ld. 9. Táblázat.

Módszer

A vizsgálathoz 250 g talajmintát használunk szárítás nélkül. Referenciaként tiszta erdei talaj szolgál, a hígítást pedig OECD talajjal végezzük.

A 750 ml-es befőttesüvegbe mért talajra mintánként 10-10 azonos korú gilisztát helyezünk, majd sötét szobában két hétig tároljuk. A tesztedényeket nem zárjuk le, kétnaponta ellenőrizzük a talaj felületét, és szükség esetén nedvesítjük. Arra nagyon figyelni kell, hogy hasonlóan a fenntartáshoz, itt sem szabad felgyülnie víznek a tesztedény alján. A két hetes akut teszt ideje alatt nem etetjük az állatokat. Reprodukтивitási teszt esetében tápanyagpótlásról kell gondoskodni.

Kiértékelés

- Az akut toxicitási teszt értékelésekor végpontként az életben maradt állatok számát vesszük. A teszt akkor fogadható el hitelesnek, ha a referencia tesztben a halálozási arány nem haladja meg az irodalomban megadott 10 % -ot.
- Két hét elteltével a mintákat vízzel felfuszpendáljuk ügyelve, nehogy megsértsük a gilisztákat. Végül egy tálcára borítjuk a mintát és megszámloljuk az életben maradt egyedeket. A túlélő giliszták számát ábrázoljuk a koncentráció függvényében.
- Reprodukivitási teszt esetében minden 1 cm-nél nagyobb utódot megszámlolunk. Az utódok méreteloszlását is vizsgálhatjuk.
- Bioakkumulációs teszt esetén a gilisztákat kiéheztetése és kiürülés után analizálják.

4.2. Talaj saját aktivitásainak felhasználása ökotoxikológiai jellemzésre

Ebben a fejezetben a talaj saját biológiai aktivitásának vizsgálatát, a vizsgálatok célját és az eredmények felhasználását tárgyaljuk nemzetközi publikációk és saját gyakorlatunk és tapasztalataink alapján.

A talaj biológiai állapotának jellemzésére mind a benne élő mikroorganizmusokat, mind pedig ezen mikroorganizmusok működését jelző enzimeket mérhetjük. Talaj állapotának jellemzésére használhatjuk a biológiai aktivitások abszolút értékét, időbeni változásait és relatív csökkenését.

Bizonyos mikrobiológiai és enzimológiai jellemzők **abszolút értéke is minősítheti a talajt**, mert arányos a talaj biológiai, ökotoxikológiai állapotával. Ezek olyan biológiai paraméterek, amelyek értéke egészséges talaj esetében ismert határok között mozog. Ilyen az aerob heterotróf sejtek száma.

Vannak olyan paraméterek, amelyek értéke nagyban függ a talaj minőségétől, a szennyezettség korától, stb. Ezeknél általában csak **más fizikai-kémiai illetve biológiai vizsgálati eredményekkel együtt értékelve** ad a biológiai állapotjellemezés megfelelő felvilágosítást. Ilyen az energiatermelésből (légzés) adódó CO₂ termelés. A CO₂ átlagosnál nagyobb értéke utalhat nagy aktivitásra, intenzív mineralizációra, de utalhat szennyezettségre is. A CO₂ termelés csökkent volta jelentheti azt, hogy megtisztult a talaj, de azt is, hogy a szennyezőanyag mérgezi a mikrobákat, gátolja működésüket. Ennek eldöntésére mind biológiai (élősejtszám, ökotoxicitás), mind kémiai (szennyezőanyag analitika) kiegészítő vizsgálat szükséges.

Legtöbbször **a biológiai paraméterek időbeni változása** ad megfelelő információt a talaj állapotáról. Az adatokat szolgáltató időbeni változások lehetnek zavartalan rendszerben mért folyamatos változások, vagy tervezett módon impulzusszerűen „megzavart” kísérleti rendszerben mért változások. Például a CO₂ produkció időbeni változása mind zavartalan rendszerben, mind impulzusszerű beavatkozásra

(levegőztetés indítása, könnyen bontható szubsztrát adagolása, stb.), mind folyamatos beavatkozásra (folyamatos levegőztetés, szennyezőanyag és tápanyag betáplálás) alkalmas kísérleti rendszerben többletinformációt ad a folyamatok dinamizmusáról, vagy a beavatkozás következményeiről, melyek alapján a tervezett technológiai beavatkozások várható eredményére extrapolálhatunk.

A talaj saját aktivitásait ökotoxikológiai teszteléshez úgy is használhatjuk, hogy egy átlagos, jó minőségű referencialaj aktivitásait vesszük alapul, ezt a **referencialajt, mint „tesztorganizmust” használjuk**. Az ilyen típusú teszteknel a vizsgálandó talaj növekvő hígításait adjuk a referencia talajhoz. A referencialaj aktivitásának koncentrációfüggését ábrázolva leolvashatjuk azt a szennyezett talajmennyiséget, amely a referencialaj aktivitását 20% vagy 50%-ra csökkentette, azaz EC₂₀, EC₅₀, illetve ED₂₀, ED₅₀ értékek határozhatóak meg.

4.2.1. Aerob heterotróf sejtszám mérése tenyésztési technikákkal

A talaj általános állapotára ad felvilágosítást a heterotróf sejtek száma. Jó minőségű talajban, a talaj típusától, használatától, szezonális és klimatikus jellemzőktől függően tág határok között változhat ugyan, abszolút értéke mégis felvilágosítást ad a szakember számára a talaj biológiai állapotáról, aktivitásáról, esetleges károsodásáról. Egyszeri állapotfelméréshez képest több információt szolgáltat egy idősorhoz tartozó sejtszám adat (monitoring), vagyis az élősejtek számának időbeni változása. A szennyezési esetet követő időszakban vagy a remediáció során mért értékek a talaj általános állapotát, a toxicitást, a körülményeket, technológia alkalmazása esetén a technológiai paraméterek megfelelő voltát lehet segítségükkel kontrollálni.

Talaj élősejt számának meghatározása telepkepződés alapján

Az eljárás alapelve az, hogy a mikroorganizmusokat különböző koncentrációban tartalmazó sejtszuszpenziókból a baktériumokat a számukra megfelelő tápanyagokat tartalmazó közegbe (esetünkben húslé-agar) visszük, majd kedvező hőmérsékleti körülmények közt termosztálva hagyjuk, hogy minden sejtből telep fejlődjék. Ezeket megszámlálva nyerhetünk információt a mikroorganizmusok mennyiségi eloszlásáról a vizsgált talajban. A helyes eredmény feltétele, hogy minden élő sejtől egy telep fejlődjék. Ezt a helyes eljárás biztosítja (hígítás, homogenizálás, szaporodási feltételek biztosítása, stb.)

Táptalaj: húslé-agar

3 g húskivonat	0,5 g NaCl	
5 g glükóz	5 g pepton	
17 g agar	1000 cm ³ víz	pH~7,0

A vizsgálat menete

A vizsgálandó anyagból alapszuszpenziót készítünk 1,0 g talajminta 10 cm³ steril vízben történő elosztatásával. Ezután hígítási sort készítünk. A várható sejtszámnak megfelelő hígításokból 0,1 cm³-t oltunk Petri-csészébe, húslé-agar táptalaj-

ra. A sejtszám csészénként 30-300 darab között jól számlálható. A vizsgálatoknál általában a 10^2 , 10^3 , 10^4 hígítás került leoltásra. $0,1 \text{ cm}^3$ hígított talajszuszpenziót megolvasztott és kb. 45°C -ra visszahűtött húslé-agarba keverünk. Alternatív megoldás, hogy a talajszuszpenziót a megszilárdult tápagar felületén oszlatjuk el egyenletesen. A kihűlt, megszilárdult elegyet tartalmazó csészét fordított helyzetben (a víz kondenzáció miatt) termosztátba helyezük és 30°C -on 48 órán át inkubáljuk.

A húslé-agar tápközeg átlátszó, így belsejében a kifejlődött telepek jól felismerhetők. Ha a felületre szélesztettünk, akkor a telepek nem nőnek a tápagar belsejében, csak a felületén. Ezek megszámlálásával az aerob heterotróf sejtek számára kapunk tájékoztató értéket. Az eredményt db telepképző sejt / gramm nedves talaj mértékegységben adjuk meg. Minél több a telep, annál kisebb a hibalehetőség, azonban annál nehezebb a számolás. A módszer feltételezi azt, hogy a különböző hígításokból kivett leoltandó térfogatok hűen reprezentálják magát a hígítást. Ez kellően nagyszámú párhuzamos mellett statisztikailag teljesíthető. Három egymást követő hígításból számlálunk telepeket. Ezeket bizonyos feltételekkel átlagoljuk.

Talaj élősejt számának meghatározása határhígításos eljárással

A határhígításos eljárás lényege, hogy a vizsgálandó mintát addig hígítjuk, amíg az utolsó hígításba nagy valószínűséggel már nem kerül sejt. Tízest léptékű hígítási sorozatot készítünk a talaj vizes szuszpenziójából. Minimum három párhuzamosra van szükség. A végpont lehet a szaporodás, más életfunkció vagy enzimaktivitás. Az értékelést ismert valószínűségi eloszlás alapján végezzük, így a legvalószínűbb élősejtszámot (MPN) a Hoskins-féle táblázatok közül abból olvassuk le, amely a párhuzamos vizsgálatok száma szerint megfelelő (Puskás, 1990).

4.2.2. Szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározás

Szénhidrogéneket és más szerves szennyezőanyagokat bontó baktériumok számát határhígításos eljárással határozzuk meg olyan tápoldatban történő tenyésztés után, mely egyedüli szénforrásként a vizsgálandó szerves anyagot tartalmazza. A statisztikai módszerrel meghatározott sejtszám értéket „legvalószínűbb sejtszámnak” nevezik, és az angol „most probable number” rövidítéseként MPN módszerként is jelölik.

A vizsgálathoz alapsuszpenziót, majd tízes léptékű hígítási sorozatot kell készíteni a talajból, vagy más környezeti mintából, 3-5 párhuzamossal. Megfelelő inkubáció után megfigyelhető, hogy milyen hígításokban mutatkozik mikroorganizmus növekedés vagy aktivitás. A módszer kivitelezésénél az alapsuszpenziót addig hígítjuk, amíg az utolsó hígítás 1 ml-ében valószínűleg már nincs a szénhidrogén bontására képes élő sejt. A hígítás olyan alapsóoldatban történik, amelyben energiatermelésre alkalmas szerves szubsztrát nincsen. Ezekhez a szubsztrátmentes tesztcsővekhez adjuk azt a steril szénhidrogént vagy más szerves szennyezőanyagot (pl. dízelolaj, pakura, kőszénkátrány olaj, PAHok, peszticidek stb.), melynek bontására képes mikrobák jelenlétét akarjuk bizonyítani, vagy számát akarjuk meghatározni.

A vizsgálat célja

1. A mérés célja lehet pusztán az, hogy bizonyítékot szolgáltatson arra, hogy a talaj tartalmaz a kérdéses szennyezőanyagra specializálódott bontó mikroorganizmusokat.
2. Ez természetesen megfordítva is értelmezhető: ha vannak a talajban specializálódott mikroorganizmusok, akkor nagyon valószínű a szennyezőanyag jelenléte.
3. Másik célja lehet a vizsgálatnak, hogy különböző mértékű hígításokkal körbehatárolja azt a hígítást, amelyben milliliterenként már csak egy mikroba van jelen, vagyis meghatározza a bontóképességgel rendelkező sejtek legvalószínűbb számát a talajban. Ebből a sejszámból a talaj bontó aktivitásának mértékére lehet következtetni, amely a bioremediáció tervezésénél igen fontos információ.
4. Ha izolálni is szeretnénk a specializálódott mikroorganizmusokat, akkor a speciális bontóképesség meghatározásához használt, csak a bontandó szubsztrátot tartalmazó határhígítási sorozatot dúsító tápoldatként fogjuk fel, és abból kiindulva izoláljuk a bontó mikroorganizmusokat.

Tápoldat

A hígításhoz felhasznált, szubsztrát-mentes tápsóoldat összetétele: 1 dm³ desztillált vízben

0,6 g	KH ₂ PO ₄	0,13 g	MgCl ₂ *6H ₂ O
0,14 g	Na ₂ SO ₄	1 g	(NH ₄) ₂ *SO ₄
0,001 g	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,5 g	KNO ₃
0,5 g	NaCl	1 ml	Pfennig-oldat

A vizsgálat menete

A környezeti mintákból 3-5 párhuzamossal végezzük a kérdéses szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározását.

A vizsgálandó mintákból steril kémcsövekbe 0,5-0,5 g-t mérünk be, amit 4,5 ml tápsóoldatban szuszpendálunk. Ebből a szuszpenzióból készítünk tízes léptékű hígítási sort, tápsóoldatban.

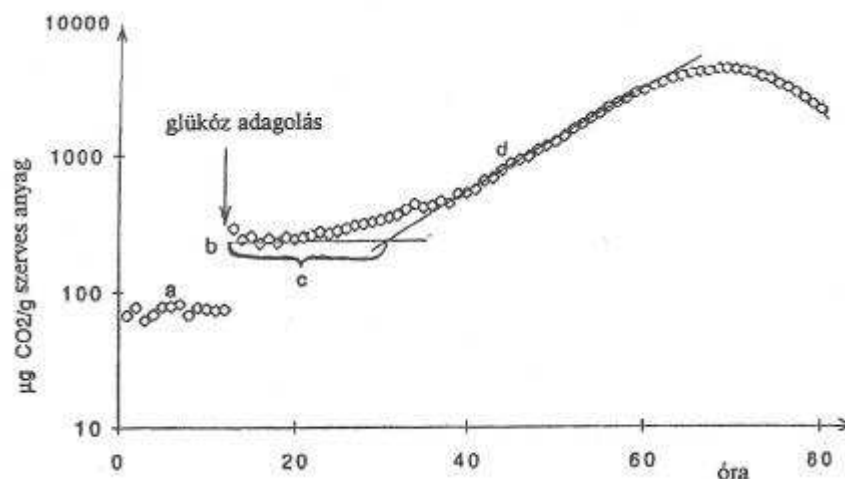
Ezután minden egyes szuszpenzióba bemérünk 0,5 cm³, 1 g/cm³ töménységű steril INT (2-(p-jódfenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazólium-klorid) oldatot. Ez a halványsárga reagens mesterséges elektronakceptorként szolgál. Az INT oldat sterilizálásának biztosítása végett 0,45 μm pórusátmérőjű membránszűrőn csíramentesítjük az oldatot. Ha az adott hígításban akár egyetlen élő, a kérdéses szerves szennyezőanyag bontására képes sejt volt, akkor az elkezd szaporodni a szennyezőanyag egyedüli szénforrásként tartalmazó csőben. A légzési lánc anyagcsere-folyamatainak következtében az INT rózsaszínűvé redukálódik, így jelezve a mikrobiológiai aktivitást. Végül minden egyes szuszpenzióhoz 5 μl steril vizsgálandó szerves szennyező-

anyagot adunk. Ilyenkor a vizsgálandó szénhidrogén az egyedüli szénforrás a rendszerben, így a kémcsövekben mutatkozó elszíneződés (az anyagcsere következtében) a szénhidrogén felhasználásának köszönhető.

Az így előkészített kémcsöveket a szubsztrát bonthatóságának függvényében 48 órától 2 hétig, 30 °C-os termosztátban inkubáljuk. A párhuzamos sorozatokban pozitívnak minősített kémcsövek számából a hígítások ismeretében a Hoskins-féle táblázat segítségével határozzuk meg a legvalószínűbb előcsíraszámot.

4.2.3. Talajlégzés mérése a termelt CO₂ alapján

A talaj állapota, aktivitása úgy jellemezhető talajlégzési teszttel a legegyszerűbben, hogy a megfelelően előkészített és levegőztetett talaj széndioxid termelését folyamatosan mérjük. A termelt széndioxid abszolút mennyisége is alkalmas durva jellemzésre, de a folyamat dinamikáját jobban jellemzi az a módszer, amit Torstensson (1994) javasol.



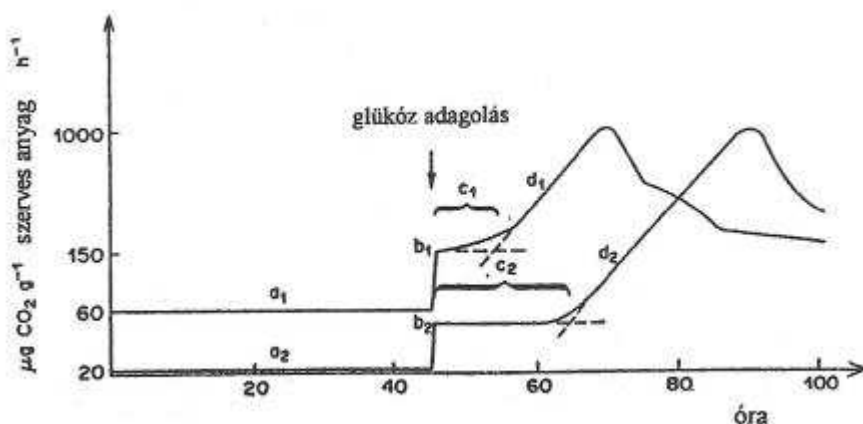
19. ábra: Talajlégzés könnyen bontható szubsztrát (glükóz) adagolása előtt és után (Torstensson, 1994)

- a – Talajlégzés mértéke alapállapotban, szubsztrát adagolása nélkül. Ez az érték jellemzi a teljes mikrobiális aktivitást a talajban.
- b – Talajlégzés mértéke könnyen bontható szubsztrát (glükóz) adagolása után.
- c – Lag szakasz. A glükóz adagolása után az exponenciális növekedés megindulásáig eltelt idő. Ez az érték jelzi a mikroorganizmusok életképességét.
- d – Növekedési konstans a légzési ráta exponenciális növekedési szakaszában.

A talajlégzés folyamatos mérése közben bontható szubsztrátot adagolunk a rendszerhez. A pillanatszerű beadagolás hatására bekövetkező légzésintenzitás nö-

vekedést a széndioxid termelés időgörbéjének meredekségével lehet jellemezni. A széndioxid termelés alapján mért talajlégzés mind tiszta, mind szennyezett talajok esetében jellemzi a talaj állapotát. A dinamikus vizsgálat szintén alkalmas mind tiszta, mind szennyezett talajok jellemzésére, várható viselkedésük vizsgálatára.

A 19. ábra és a 20. ábra a talajlégzés intenzitását mutatja szubsztrát adagolás előtt és után szennyezett és szennyezőanyagot nem tartalmazó talajokban.



20. ábra: Talajlégzés könnyen bontható szubsztrát adagolása előtt és után, szennyezetlen és fémekkel szennyezett talaj esetén (Torstensson, 1994)

- a – Talajlégzés mértéke alapállapotban, szubsztrát adagolása nélkül. Ez az érték jellemzi a teljes mikrobiális aktivitást a talajban.
 - b – Talajlégzés mértéke könnyen bontható szubsztrát (glükóz) adagolása után.
 - c – Lag szakasz. A glükóz adagolása után az exponenciális növekedés megindulásáig eltelt idő. Ez az érték jelzi a mikroorganizmusok életképességét.
 - d – Növekedési konstans a légzési ráta exponenciális növekedési szakaszában.
- Index 1: szennyezetlen talaj, index 2: fémekkel szennyezett talaj.

Hasonló tesztmódszert dolgoztunk ki a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén. Egy minireaktoros rendszert használnak szennyezett talajok jellemzésére, a szennyezőanyagok biodegradálhatóságának vizsgálatára és a bioremediáció technológiai paramétereinek tájékoztató jellegű kimérésére.

A következő, 21. ábra a tanszéken tervezett minireaktort és a talajlégzés mérésére alkalmazott mérőrendszert mutatja.



21. ábra: A talajlégzés mérésére szolgáló rendszer ábrája

A mérőrendszer összeállítása

A mérőrendszer szerves anyagokkal szennyezett talaj mikrobiológiai állapotára ad felvilágosítást. Segítségével megállapítható, hogy van-e a talajban működőképes mikroflóra, aktiválható-e a technológiai paraméterek megváltoztatásával (pl. levegőtetéssel, hozzáférhetőséget fokozó adalékanyagok adagolásával). A talaj származhat szennyezett területről, de vizsgálhatunk mesterséges szennyezett talajokat is.

Az oszlopreaktor

A talajlégzést vizsgáló teszrendszerben központi szerepe van egy folyamatosan levegőztethető 1100 cm³ hasznos térfogatú üvegreaktorok. Az üvegreaktor aljára kavicsréteget, erre pedig vászonlapot teszünk a levegőztető eldugulásának elkerülésére. A reaktor tetejéhez gumidugó, üvegcső és gumicső segítségével csatlakozik a vízszugárszivattyú, melynek segítségével levegőt áramoltatunk át a rendszeren. A talajjal töltött reaktor előtt kétszeres, lúgos elnyeletéssel eltávolítható a levegő CO₂ tartalma. Így titrálás során már csak azt a CO₂-t mérjük, amely a mikroorganizmusok életműködéséből származik, tehát az olajbontást jellemzi.

A mérés célja

A légzést mérő teszrendszer segítségével választ kaphatunk a következőkre:

- szennyezett-e a talaj,
- toxikusan hat-e a szennyezőanyag, gátolt-e a mikrobák működése,
- adaptálódott-e a mikroflóra és aktívan működik-e,
- aktiválható-e a mikroflóra,
- ha aktiválható a mikroflóra, milyen technológiai paraméterekre van szükség az optimális működéshez.

A termelődött CO₂ mennyisége arányos az elbontott szénhidrogén mennyiségével, a biológiai oxidáció mértékével, tehát a rendszer alkalmas, mind a talaj bioló-

giai állapotának felmérésére, mind a biodegradáció folyamatának jellemzésére és követésére.

A szénhidrogén vagy más szerves szennyezőanyag típusából, a talaj fajtájából, a szennyezőanyag korából és koncentrációjából adódó különbségek kimérésére is alkalmazható a mérőrendszer.

A technológiát tekintve válasz kapható például arra, hogy milyen mértékű levegőztetésre van szükség a mikroflóra aktiválásához. Szükség van-e tápanyag adagolásra (N-, P-forrás), szükségese-e adalékanyagok (pl. hozzáférhetőséget javító anyagok).

Karbonátos talajok esetén a felszabaduló CO₂ zavarhatja a mérést.

A mérés kivitelezése

A mérés során általában szennyezett talajokat vizsgálunk. Az oszlopreaktorba töltött vizsgálandó talajjal elindítjuk a levegőztetést. A CO₂ termelődés felfutását és állandósult állapotát mérhetjük megfelelő gyakorisággal végzett CO₂ meghatározással.

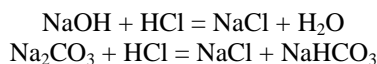
1. A szennyezett talaj levegőztetése
2. A termelt CO₂ mennyiségének meghatározása
3. Termelődött CO₂ mennyiségének ábrázolása az idő függvényében

Az egyensúlyi helyzetbe került talajt impulzusszerűen kitehetjük szennyezőanyag és adalékanyagok hatásának, a levegőztetés mértékének megváltoztatásának, stb. Az impulzusszerű hatásra adott válasz gyorsaságából, a felfutás meredekségéből következtethetünk a talaj állapotára, terhelhetőségére és a remediációjánál szükséges technológiai paraméterekre.

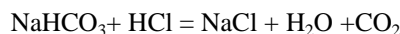
CO₂ mennyiségi meghatározása

A meghatározás gázanalitikai módszerrel, sav-bázis titrálással történik. A CO₂ elnyeletését 150 cm³-es gázmosópalackban, 100 cm³ 1 mólos NaOH oldatban végezzük. Az elnyeletés után a lúgoldatból 10 cm³ térfogatú mintákat titrálunk. 3 párhuzamos mérést végzünk.

A titrálás menete: a mintát 3 csepp fenolftalein indikátor jelenlétében 0,1 mólos HCl oldattal halványrózsaszínig titráljuk. A reakciók:



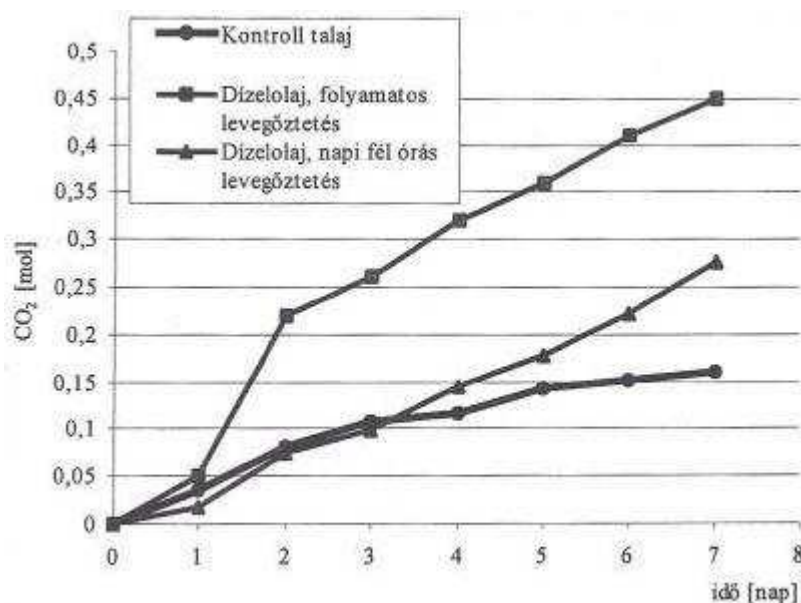
Ezután 3 csepp metilvörös indikátor jelenlétében hagymaszínig titráljuk a bürettában levő 0,1 mólos faktorozott HCl-val. A végpont előtt az oldatot kiforraljuk, majd hűtés után tovább titráljuk hagymaszínig.



Fontos, hogy a titrálást viszonylag alacsony hőmérsékleten (15 °C körül), az erős rázogatótást kerülve végezzük.

A termelődött CO₂ mennyiségét ábrázolva az idő függvényében egy görbét kapunk, melynek meredeksége jellemző a szennyezőanyag biodegradálhatóságára, a vizsgált talaj biológiai aktivitására.

A következő diagram a széndioxid-termelés időgörbéje, a levegőztetési mód hatását mutatja dízelolajjal szennyezett talaj esetén.



22. ábra: A levegőztetés mértékének hatása a dízelolaj biodegradációjára

Az 22. ábra jól szemlélteti, hogy a levegőztetésnek nagy szerepe van az olajbontás intenzifikálásában. Folyamatos (napi 24 órás) levegőztetés hatására már a második naptól megindul az intenzív CO₂ termelés (a biodegradáció), míg kisebb mértékű (napi fél óras) levegőztetés hatására csak a negyedik nap után indul meg az intenzív olajbontás. Itt csak a negyedik naptól tapasztalunk a folyamatosan levegőztetett kontroll (szennyezőanyagot nem tartalmazó) talajétól eltérő nagyobb mértékű CO₂ termelést.

4.3. Egészséges talaj mint tesztorganizmus

A talaj egyes igen érzékeny aktivitásait csak relatív értelemben tudjuk értékelni, mert az abszolút érték vagy nem mond sokat, vagy nincs elég tapasztalatunk az értelmezéséhez. A heterotróf sejtek számának és a légzés mérésének tárgyalásakor említettük, hogy ezek a jellemzők alkalmasak ökotoxikológiai jellemzésre, hiszen mind a sejtszám, mind a sejtek légzése érzékenyen reagál a toxikus hatásokra. Ugyanakkor a legtöbb talaj képes adaptálódni a toxikus hatásokhoz, tehát a toxikus anyag gátlása, az aktivitás csökkenése csak átmeneti jellegű.

A mikrokozmosz tesztek egy speciális megoldása talajoknál, hogy garantált és állandó minőségű törzstalaj ökoszisztémáját tesszük ki a tesztelendő vegyi anyag különböző koncentrációinak és talaj enzimaktivitásainak, sejtszámának, fajeloszlásának, stb. változását vizsgáljuk a vegyi anyag növekvő koncentrációjának függvényében.

Ökotoxikológiai tesztelés céljára alkalmas aktivitásnak ítéljük a talajok nitrifikáló aktivitását és ATP tartalmát. Szennyeződés által még nem érintett (tehát nem adaptálódott) tiszta talaj aktivitását gátolják a toxikus szennyezőanyagok. Ha egy jó minőségű, nem szennyezett, pl. erdei talaj (referencia talaj) nitrifikáló aktivitását megmérjük tisztán és mesterséges szennyezés után, tetemes csökkenést fogunk tapasztalni. Ugyanez játszódik le, ha a referencia talajhoz szennyezett talajt vagy más szennyezőanyagot tartalmazó környezeti mintát adunk. Ilyen értelemben a referenciatalaj egy ökotoxikológiai tesztorganizmus, a szóban forgó biológiai aktivitás pedig a mérhető végpont.

A referenciatalajhoz különböző mennyiségű vizsgálandó mintát téve olyan koncentrációsorozatot állíthatunk elő, amelynek eredményével felvett görbéből EC_{20} , EC_{50} , vagy ED_{20} és ED_{50} értékek határozhatóak meg a szennyezőanyag koncentrációja, vagy a szennyezett talaj mennyisége alapján.

4.3.1. A talaj nitrifikációja

A teszt típusa, alkalmazhatósága: A nitrifikálás abszolút értéke is jellemzi a talaj minőségét. A nitrifikáció időbeni változása, vagy szennyeződés hatására bekövetkező változása a talaj terhelhetőségét jellemzi.

A talaj nitrifikáló képességének toxikus hatásokra bekövetkező csökkenése arányos a káros hatást okozó vegyi anyag koncentrációjával, ennek alapján a nitrifikáló aktivitás felhasználható ökotoxikológiai tesztelésre, mind tiszta vegyi anyagok, mind szennyezett környezeti elemek esetében.

A nitrifikálás mennyiségi jellemzésére hagyományos és gyorsesztek léteznek. Kis méretben, 20 g talajból már lehet ammónium oxidációt mérni.

A tesztelés időtartama: a gyorseszteszt 5 órát vesz igénybe.

Végpont: a nitrit nitráttá oxidációja megakadályozható, így a kényelmes nitrit-kimutatás lehet a végpont. Referencia talajhoz keverve a vizsgálandó minta hígításait EC₂₀ és EC₅₀ illetve ED₂₀ és ED₅₀ meghatározható.

Szükséges műszer: a méréséhez fotométer szükséges.

Szabvány módszerek: Az ISO 9509 alapul vehető. A mérés részleteit és ökotoxikológiai tesztként való használatát a BME MGKT-n dolgozták ki.

Anyagok és módszer

Alkalmazott oldatok:

Puffer oldat:	1,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,381 g KH ₂ PO ₄ 1,253 g K ₂ HPO ₄ 0,004 g NaHCO ₃ desztillált vízzel 250 ml-re feltöltve, pH~7,2
Klorát oldat	0,798 g NaClO ₃ desztillált vízzel 25 ml- re feltöltve
Leállító oldat (4 M KCl)	149,11 g KCl desztillált vízzel 500 ml- re feltöltve
Kalibráló oldat (100 ppm NO ₂ ⁻ - N)	0,123 g NaNO ₂ desztillált vízzel 250 ml- re feltöltve
Griess- Ilosvay reagens „A”	10 g szulfanil-amid és 52 ml cc. HCl desztillált vízzel 1000 ml- re feltöltve
Griess- Ilosvay reagens „B”	0,5g N-(naftil-(1)-etilén-diammónium-klorid) desztillált vízzel 500 ml- re feltöltve

Eszközök:

Centrifuga, centrifugacsövek (műanyag, csavaros, 50ml-es),
spektrofotométer (KONTRON UVIKON 725),
rázógép,
pipetták.

A mérés menete:

1. 2,5 g talajt 50 ml-es csavaros centrifugacsövekbe teszünk,
2. hozzáadunk 5 ml desztillált vizet, 5 ml puffer- oldatot és 0,5 ml klorát- oldatot,
3. 30 °C- on rázatjuk.
4. 2, 4, 6 óra elteltével mintavétel: 2- 2 ml talaj szuszpenziót kiveszünk a centrifugacsövekből, és hozzáadunk 2- 2 ml leállító oldatot, ezzel blokkoljuk a nitrit termelést.
5. 3000- 4000 rpm- en centrifugáljuk 10 percet.
6. A folyadékfázist kémcsőbe öntjük, és 1- 1 cseppet adunk mindkét Griess-Ilosvay oldatból.
7. 5 percet állni hagyjuk, míg a jellegzetes piros szín megjelenik.
8. 540 nm-en mérjük a denzitást.

Kalibráció

1. A kalibráció különböző koncentrációjú NaNO_2 - tel készül, KCl oldatban.
2. A kalibráló oldat NO_2^- -N koncentrációi: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 mg/dm^3 .
3. Vak oldat: 2 M-os KCl, amelyhez a többi mintához hasonlóan hozzáadjuk a Griess- Ilosvay reagenst

A kalibrációs egyeneshez mért értékek:

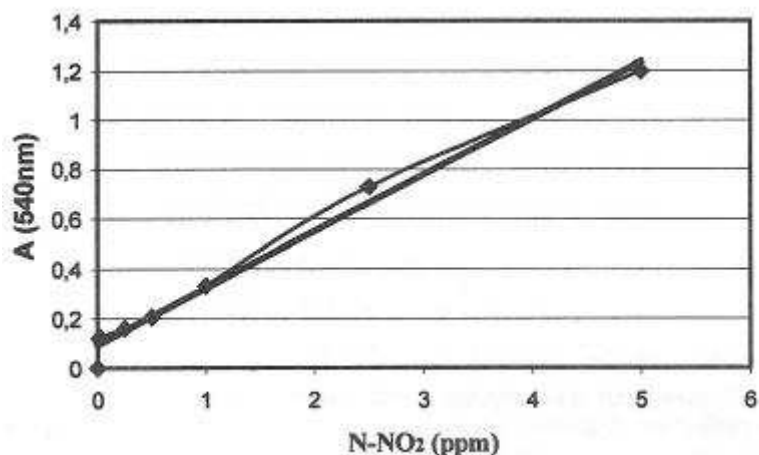
N-NO₂ (ppm)	A (540nm)
0	0
0,01	0,12
0,025	0,13
0,25	0,16
0,5	0,21
1	0,33
2,5	0,73
5	1,20

Értékelés

A fotometriás mérés során kapott abszorbancia értékeket először a kalibráció alapján a NO_2^- -N (nitrit-nitrogén) koncentrációkká kell átszámítani. Mivel a talajminták nedvességtartalma különböző, ezért minden alkalommal a talaj szárazanyag tartalmára kell vonatkoztatni a kapott értékeket. Az így kapott koncentrációk az idő függvényében olyan pontokat eredményeznek, amelyre egyenes illeszthető.

Az egyenes meredeksége összefügg a minta toxicitásával (minél toxikusabb a minta, annál kisebb a meredekség), ami az időegység alatti nitrit termelést adja meg.

Az értékelés megkönnyítése, valamint pontosabbá tétele céljából a kapott egyenesek alatti területet használjuk az összehasonlításhoz, melyet trapéz módszerrel határozunk meg. Ezeket az értékeket az egyenesek meredekségével együtt kell figyelembe venni. A meredekség alapján lehet megállapítani, ugyanis, hogy a nitrifikáló aktivitás a folyamat alatt csökken, vagy növekszik. A területek mennyiségi információkat közölnek a nitrifikálásra vonatkozóan. Az egyenes meredeksége az adott idő alatti nitrifikáló aktivitás erősödését vagy lassulását (a változás sebességét) fejezi ki, míg az egyenes alatti terület összehasonlításra alkalmas, konkrét értékeket nyújt.



23. ábra: Kalibrációs egyenes a nitrittartalom meghatározásához

Jelölések: A: abszorbancia NO₂⁻-N: nitritben megadott nitrogén koncentráció (ppm)

A számításhoz felhasználandó egyenletek:

$$[1] \quad y = 0,2282 \cdot a + 0,0939$$

ahol y: NO₂⁻-N koncentráció (ppm) a: abszorbancia érték.

$$[2] \quad E = (y \cdot V) / (m \cdot n)$$

ahol E: NO₂⁻-N g talajonként (μg) y: NO₂⁻-N konc. (ppm)
 V: hozzáadott oldószer térfogat (cm³) m: légszáraz talaj tömege (g)
 n: talajminta nedvesség tartalma (%)

$$[3] \quad T = (a + c) \cdot t / 2$$

ahol T: a görbe alatti terület t: eltelt idő (4 óra)
 a: E (μg NO₂⁻-N g talajonként) a második órában történt mintavételkor
 c: E (μg NO₂⁻-N g talajonként) a hatodik órában történt mintavételkor

Ökotoxikológiai tesztelés a referencialalaj nitrifikálás-gátlása alapján

A referencialalajt mint kvázi tesztorganizmust a szennyezőanyag vagy a szennyezett környezeti minta különböző mennyiségeinek tesszük ki. A nitrifikáció-koncentráció összefüggést mutató görbe alapján EC₂₀ és EC₅₀ érték olvasható le ismert koncentrációjú vegyi anyagok esetén, ED₂₀ és ED₅₀ érték ismeretlen koncentrációjú, de ismert mennyiségű szennyezett talaj esetén. Az ED értékeket kifejezhetjük valamely, jól ismert, gátló hatású toxikus vegyi anyag egyenértékékként, hasonlóan a Cu-egyenértékben kifejezett lumineszcencia gátlás esetéhez (4.1.1.1. fejezet).

4.3.2. A talaj ATP tartalma

A talaj ATP tartalma a benne élő sejtek mennyiségével és aktivitásával arányos. A toxikus hatásokra a talaj élővilága az ATP termelés csökkenésével reagál, mindaddig, amíg meg nem történik az adaptáció. A talaj abszolút ATP tartalmának interpretálására ma még nincs elegendő tapasztalatunk, de a relatív változások, pl. az időbeni lefutás a szennyeződés, vagy külső körülmények hatására, vagy a technológiai paraméterek hatására jelentős információ. Egy szennyezetlen, szennyezőanyaghoz nem szokott referencialaj ATP termelésének gátlása toxikus szennyezőanyagok vagy szennyezett környezeti elemek hatására mérhető, és az ATP mennyiség végpontként történő felhasználása érzékeny ökotoxikológiai tesztmódszert eredményez.

Az ATP biolumineszcencia a következő egyenleten alapul:



Ahol: AMP: adenzin monofoszfát PP_i: szervetlen foszfát

A méréshez szükséges reagensek

Az ATP mennyiségi detektálásához többek között - a Lumac és a BioOrbit - Biomass Kit-jeit használhatóak. A kétféle kit különbsége abból áll, hogy a BioOrbit kit belső standard módszerrel dolgozik, míg a Lumac kit standardizálás alapján előre meghatározott konstans alapján számítja a minta ATP tartalmát. A mérésekhez a kitben lévő anyagokon kívül csak ATP standardra van szükség.

Az ATP standardot mindig a luminométer méréshatárához hígítjuk. Az ATP standard összetétele:

ATP dinátrium sója	10 mg
glicin	3,6 mmol
ditiotritol	0,18 mg
bovin szérum albumin	0,2 mg

A mérés

A vizsgálandó talajmintákhoz tiszta ATP oldatot és/vagy ismert ATP tartalmú sejtszuspenziót adunk belső standardként. A belső standard hozzáadás több módon történhet:

1. A talajmintákból hígítási sort készítünk, majd ehhez adjuk hozzá vagy a sejtszuspenziót vagy az ATP oldatot.
2. a talajmintákhoz vagy sejtszuspenziót vagy ATP oldatot adunk, majd utána végezzük el a hígítást.
3. A talajmintákat először sterilizzük, majd utána végezzük el az ATP oldat vagy a sejtszuspenzió hozzáadását.
4. Az így előkészített mintának mérjük a beütésszámát.

Lumac kit esetén:

Az előkészített mintákból 100 µl a luminométer küvettáiba pipettázunk, majd hozzáadunk a sejtfeltáró reagensből 100 µl-t. Ekkor mérjük meg a vak értéket Lumac Biocounter M1500 készülékkel. Ezután adjuk a mintához 100 µl luciferázt tartalmazó reagenst, majd összekeverés után megmérjük a minta beütésszámát.

A módszerhez standardizálás is tartozik, hogy a műszer okozta hibákat kiküszöböljük. A standardizálást a következőképpen végezzük el. A már lemért mintához - ami tartalmazza a luciferáz reagenst - ismert mennyiségű ATP oldatot adunk, összekeverjük, majd megmérjük a beütésszámát.

BioOrbit kit esetén:

Az előkészített mintákból 100 µl a luminométer küvettáiba pipettázunk, majd hozzáadunk a sejtfeltáró reagensből 100 µl-t. Ekkor mérjük meg a vak értéket a Lumac Biocounter M1500 -zal. Ezután 500 µl luciferázt tartalmazó reagenst adunk a mintához, majd összekeverés után megmérjük a minta beütésszámát. Ezután minden egyes mintához hozzámérjük a belső standardként szolgáló ATP oldatból 10 µl-t, majd újból megmérjük a minta beütésszámát.

A mérés kiértékelése

Lumac kit esetén

A minta ATP tartalmának kiszámításánál a minta beütésszámából kivonjuk a vak értékét, majd szorozzuk a standardizálással megállapított konstanssal. A konstans meghatározása

$$K = \text{Hozzáadott ATP} / (\text{a minta beütésszáma} - \text{vak})$$

$$\text{A minta ATP-tartalma} = K * (\text{minta beütésszáma} - \text{vak})$$

BioOrbit kit esetén

A számításnál először a minta beütésszámából kivonjuk a vak értékét és a következők szerint kiszámoljuk a minta ATP tartalmát µg-ban:

$$\text{ATP } (\mu\text{g}) = (S - B) / (I - S), \text{ ahol}$$

S: a minta vagy a kontroll beütésszáma

B: a reagens háttér értéke

I: a minta vagy a kontroll beütésszáma a 10 µl ATP standard hozzáadása után

4.4. Mikrokozmosz kísérletek bioremediáció követésére

Azokat a rendszereket nevezik mikrokozmosznak vagy mikroöko-rendszereknek, amiket a természetes ökoszisztémákból származtatnak, de térben és időben el vannak azoktól különítve. Bonyolultabbak az egy fajta alkalmazó tesztekénél, tehát van mód, pl. a fajok közötti kölcsönhatások vizsgálatára, de ahhoz elég egyszerűek, hogy jól lehessen kísérletezni velük. Fő céljuk, hogy megértsük a természetes rendszer egy vizsgált részének viselkedését. A mikrokozmosz vizsgálat lehet *teszt* vagy *kísérlet*. A mikrokozmosz kísérleteknél, szemben a tesztekkel nem csak a természetes próbát modellezni, hanem bele is avatkozunk a természetes folyamatokba: provokáljuk a rendszert, mesterséges módon (Calow, 1993).

4.4.1. Fémmel szennyezett talajok vizsgálata

A toxikus fémekkel szennyezett talajok mikrokozmoszban történő tesztelése azokat az előre rosszul kiszámítható vagy nehezen modellezhető folyamatokat igyekszik tisztázni, amelyek toxikus fémek környezeti kockázatának megítélésében, és a remediációban jelentősek. Ilyen fontos és veszélyes folyamat a toxikus fém talajból talajvízbe oldódása, a talajt alkotó kőzetekből való kioldódása, feltáródása, a kémiai formától és a kölcsönhatásoktól függő mobilizálódása és immobilizálódása.

4.4.1.1. A fémkioldás vizsgálata

A fémek mobilizálódása mind a kockázat (talajvízre), mind pedig a fémek kioldással történő remediációja során fontos folyamat. Ennek vizsgálatát szolgálják a szakaszos, vagy folytonos kioldást modellező mikrokozmosz kísérletek

Egylépcsős, szakaszos fémkioldási eljárás

Előkísérletek: 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba 6-6 g fémtartalmú talajmintát és 30 ml oldószert (víz, szerves vagy szervetlen savak, stb.) teszünk (1:5 szilárd-folyadék arány). A lombikokat rázógépre helyezük, ettől számítva indul a mikrokozmosz kísérlet. A 10. percen, a 2. órában és a 24. órában 5-5 ml mintát veszünk a lombikok tartalmából. A mintákat centrifugacsövekbe töltjük, majd 15 percig 6-7000 /perc fordulatszámon centrifugáljuk, majd megvizsgáljuk a felülúszó pH-ját és fémtartalmát. Az előkísérletből információkat nyerhetünk, hogy körülbelül milyen mennyiségek és minőségek jellemezhetik a folyamatot.

A további kísérletekben az előkísérlet eredményei alapján határozzuk meg a kioldáshoz használt oldószer megfelelő koncentrációját, a kioldás optimális idejét, stb. A talajminta pH-ját a szabvány szerint 1:9 = talaj:víz arány beállításával 30 perces kevertetés után mérjük.

Folyamatosan kevert reaktor: A mikrokozmosz összeállításban 150 ml-es főzőpohárban vizsgáljuk a kioldást, mágneses keverővel biztosítva az intenzív érintkezést. Ezzel a kísérleti elrendezéssel lehetővé válik a pH és a redox-potenciál folyamatos mérése pH elektróddal. Az oldószer fémkoncentrációjának vizsgálatánál a

mintavételt az előkísérletnél leírtak szerint végezzük. A főzőpohárba 10-10 g talajmintát mérünk be, majd 90-90 ml oldószert (1:9 szilárd-folyadék arány). A kioldási folyamatot 7 órán át figyelemmel kísérjük, a kinyert fémtartalom vizsgálatához a mintát az indítástól (az oldószer hozzáadása és a keverő indítása) számított 2, 16, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 stb. percen vesszük.

Töblépcsős, szakaszos kioldási eljárás

100 ml-es Erlenmeyer-lombikba 15 g talajt mérünk be. 35 ml oldószert adunk hozzá, majd 15 percig Rotomixen rázatjuk. Mérjük a pH-t és a redox-potenciált a kísérlet elején és 15 perces kioldás után. A szuszpenziót dekantálva szűrjük vízgárgásviztató segítségével, a szűrlet fémtartalmát mérjük. Ezután a zagyhoz újabb 25 ml oldószert adagolunk, s 15 perc ráztatás után ismét elvégezzük a fentebb leírt műveleteket. A továbbiakban újra 25-25 ml fermentlevet adunk a zagyhoz, összesen öt lépésben vizsgálva a szakaszos kioldást.

Folyamatos fémtartalom kioldás

Oszlopként egy 2 cm átmérőjű, 15 cm magasságú, alul és felül kilyukasztott henger alakú műanyag csövet használunk. Az oszlopba a kísérlethez 15 g talajmintát töltünk. Alul szűrőpapír akadályozza meg az anyag kimosódását az oszlopból, felül pedig egy szűrőpapír karika biztosítja az egyenletes rátáplálást. Az oldószert perisztaltikus pumpával juttatjuk az oszlop tetejére, állandó térfogatárammal. Az oszlopot elhagyó folyadékból megfelelő időközönként (2, 5 vagy 10 perc) néhány ml mintát veszünk, pH-ját illetve fémtartalmát mérjük. Tájékozódásként megvizsgáljuk a 20 perces időintervallumokban lecsöpögő, integrált fermentlevet is. A kísérletek alatt változtatható a térfogatáram, s ezzel a tartózkodási idő.

4.4.1.2. Toxikus fémmel szennyezett talajokban végbemenő feltáródás

A toxikus fémeket tartalmazó kőzeteket alkotó ásványok gyakran nehezen feltáródó, stabil kémiai formájú vegyületek. A körülményektől, elsősorban a pH-tól és a redox-viszonyoktól függően az eredetileg immobilis, stabil kémiai formában kötött fémekek mobilissá, oldhatóvá, biológiailag felvehető formájúvá válhatnak, a talajok kialakulásánál szerepet játszó mállási folyamatokhoz hasonló folyamatok során. A környezetben gyakori, hogy nagy fémtartalmú hulladék, üledék, kőzet aktuális toxicitással nem rendelkezik, mert a fémtartalma nem hozzáférhető. Ha ezek a nagy fémtartalmú anyagok izoláltak vannak, nem jelentenek veszélyt, ha az izoláltságuk bizonytalan (pl. üledék - áradás, anaerob üledék - levegőztetés, stb.) akkor kémiai időzített bombáról beszélünk, ha a térbeli izolációból kikerülnek, akkor megindulhat a feltáródásuk, hozzáférhetővé válásuk. Aktív talajba kerülő toxikus fémtartalmú hulladék, kőzet, ásvány, üledék, stb. viszonylag gyors feltáródásnak van kitéve, hiszen az aktív talajban a mállási folyamatok gyorsak, a pH- és redox-viszonyok, a biota hatása nagyban elősegíti azokat.

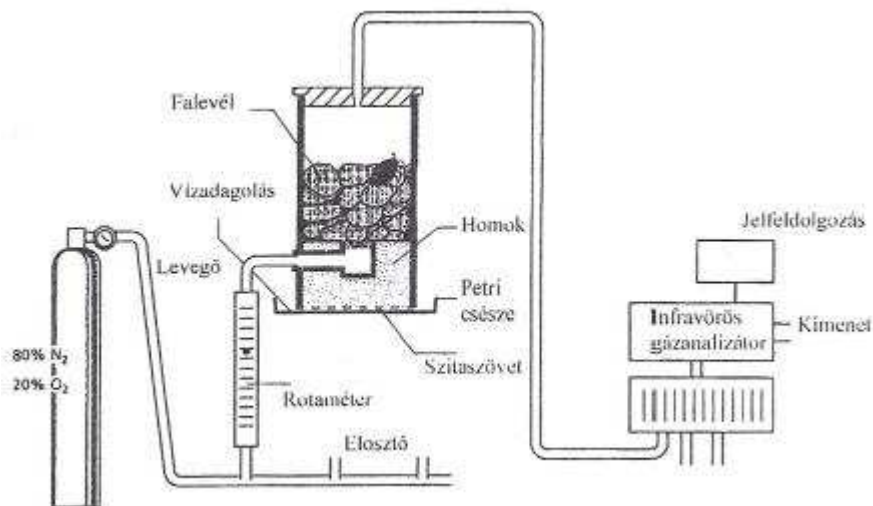
Akár a veszély megítélése, akár a technológia tervezése a célunk, meg kell ismernünk a környezetbe került toxikus fémtartalmú anyagok potenciális sorsát. Ezt segítik a feltáródás vizsgálatára kifejlesztett mezokozmosz kísérletek.

A feltáródást vizsgáló mikrokozmosz kísérleti összeállítása

A feltáródási kísérleteket 5 literes edényekben végezzük. A feltáródás szempontjából vizsgált, potenciális talaj szennyezőanyaggal és a referencia talajjal 40, 20, 10 és 5 %-os keverékeket készítünk. A mikrokozmosz edényeibe helyezett minták kezdeti tömege 3000 - 6400 g. A mikrokozmosz talajából, a céltól és a folyamat sebességétől függően heten-ként vagy havonta mintát veszünk és komplex fizikai-kémiai-biológiai-öko-toxicológiai tesztelésnek vetjük alá. Az eredmények időbeni változását értékeljük.

4.4.2. Mikrokozmosz kísérletek szerves anyagokkal szennyezett talajokkal

A szerves anyagokkal szennyezett mikrokozmoszokban vizsgálhatunk toxicitást, adaptációt, bidegradációt, technológiai paramétereket, stb. A következő ábrán egy tipikus talaj mikrokozmosz látható. (Calow, 1993)



24. ábra: Tipikus talaj-mikrokozmosz sematikus ábrája. A rendszeren levegőt áramoltatunk keresztül. A termelődött CO₂-ot infravörös gázanalizátorral mérjük.

A talajtisztítási technológiát modellező kísérlet során megfigyeljük, hogy az adalékanyagok, és a levegőztetés, milyen hatással van a talajban élő mikroflórára, annak működésére.

4.4.2.1. A mikrokozmosz alkalmazási területei

A biodegradációt vizsgáló mikrokozmosz kísérletek széles körben alkalmazhatóak talajtisztítási biotechnológiák összehasonlítására, optimalizálására, a folyamatok mélyebb kutatására, mesterségesen szennyezett vagy különféle szennyezett területekről származó talajokkal, 50-500 g, vagy nagyobb méretben.

- A kísérletekkel mind *ex situ*, mind *in situ* talajtisztítási biotechnológiákat modellezhetünk.
- *In situ* kezelést zavartalan mintában, statikus rendszerben, szilárd fázisú töltött oszlopokkal, az *ex situ* kezelést homogén szilárd fázisú vagy kevertetett iszap fázisú reaktorokkal modellezzük.
- Laboratóriumi technológiai kísérletek során vizsgáljuk a szerves szennyezőanyagok mikrobiológiai működés hatására bekövetkező degradációját, a biodegradációt befolyásoló paramétereket, a toxicitás változását a remediáció során.
- A technológiai paraméterek változtatásával (talaj nedvességtartalom változtatása, levegőztetés mértéke, hőmérséklet változtatása, tápanyagadagolás, adalékok hatása, beoltás, kevertetés) a mikrokozmosz kísérletekben lehetőség van a különböző technológiák összehasonlítására, az adott területen szóba jöhető technológia kiválasztására, tervezésére és megalapozására laboratóriumi méretben.
- Szilárd fázisú (20% nedvességtartalomig) és iszap fázisú (50 % nedvességtartalomig) kísérletekben tanulmányozhatjuk a hozzáférhetőséget segítő adalékok, a levegőztetés, a hőmérséklet, a tápanyagadagolás (N- és P-forrás) hatását a szénhidrogének biodegradációjára.
- Tesztelhetjük, hogy a különböző talajtípusok (homokos, agyagos, humuszos) mennyiben befolyásolják a szennyezőanyag a hozzáférhetőségét, a mikroflóra aktivitását, és ezek növelhetőségét.
- Vizsgálhatjuk a talaj saját, már adaptálódott mikroflórájának működését vagy előzetesen felszaporított mikrobákkal valamint kereskedelembe forgalmazott mikrobakeverékekkel történő beoltás hatását.
- A tápanyagok adagolása a talajtípus és a szennyezőanyag koncentrációjának függvényében történik.
- Mesterséges szennyezés esetén könnyen bontható szénhidrogénekkel (pl. dízelolaj) és nehezebben degradálható szénhidrogénekkel (pl. transzformátor olaj, policiklikus aromás szénhidrogének) szennyezett talajokban tanulmányozhatjuk az alkalmazott szennyezőanyag típusának és koncentrációjának hatását a biodegradációra és a toxicitására.
- Tanulmányozhatjuk az adalékanyagok biodegradációra gyakorolt hatását: hozzáférhetőséget növelő adalékok, enzimek, tápanyagok, vitaminok, egyéb aktíválószerek hatását és optimális koncentrációját.

A mikrokozmosz kísérletek során többszöri mintavételezéssel követjük a reaktorokban zajló folyamatokat és változásokat.

A mikrokozmosz kísérletek követésére alkalmazott integrált fizikai-kémiai-biológiai-ökotoxikológiai módszeregyüttes eredményei alapján választ kapunk azokra a kérdésekre, amelyek alapján lehetővé válik az optimális technológiaválasztás, a kiválasztott technológia tervezése és megalapozása, valamint a technológia monitorozása. A tesztekkel vizsgálható és eldönthető, hogy:

- milyen összetételű és hatású (toxikus, mutagén, stb.) szennyeződéssel van dolgunk,
- biodegradálható-e a szennyezőanyag,
- milyen a megoszlása a talaj egyes fázisai között,
- fizikai, kémiai vagy biológiai remediációt alkalmazunk-e,
- mennyire kockázatos a szennyezőanyag mobilizálódása,
- alkalmazható-e *in situ* remediáció, mekkora ennek a kockázata,
- anaerob vagy aerob technológiát alkalmazunk-e,
- milyen organizmusok segítségével folytassuk a remediációt (mikroorganizmus, növény),
- milyen technológiai paramétereket alkalmazunk a technológia során,
- mobilizáción vagy immobilizáción alapuljon-e a technológia,
- szükségesek-e tápanyagok, adalékanyagok és hozzáférhetőség-növelő szerek,
- szükséges-e mikrobiológiai oltóanyag, serkentőanyag,
- milyen lesz a technológia idő- és költségcsúszásgazdálkodása,
- milyen paraméterek monitorozása szükséges a technológia alkalmazása közben és után?

A mikrokozmosz kísérletek tetszés szerinti összeállításúak lehetnek, attól függően, hogy milyen kérdésre szeretnénk segítségével választ kapni.

Szerves szennyezőanyagok biodegradálhatóságának, a szennyezett talaj remediálhatóságának vizsgálatán kívül a helyspecifikus információkat kaphatunk a talaj ökoszisztémájának törvényszerűségeiről és a vegyi anyagok okozta károkról.

További előnyei a laboratóriumi mikrokozmoszoknak, hogy több, egymással összefüggő vizsgálat végezhető párhuzamosan, a folyamatok követésére használt fizikai-kémiai, biológiai és ökotoxikológiai mérési módszeregyüttesel kapott eredmények és az értékelésükhöz használt többváltozós statisztikai módszerek segítségével, komplex képet nyerhetünk a vizsgált ökoszisztémáról, annak ellenállóképességéről, alkalmazkodóképességéről, valamint az ökoszisztémához harmonikusan illeszkedő beavatkozás módjáról.

Irodalomjegyzék

- Ahlf, W. and Wild-Metzko, S.** (1991) Bioassay response to sediment elutriates and multivariate data analysis for hazard assessment of sediment-bound chemicals, *Hydrobiologia* 0, 1-4.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.** (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat.Res.* **31**, 347-364.
- Arensberg, P.; Hemmingsen, V.H. and Nyholm, N.** (1995) A miniscale Algal toxicity test. *Chemosphere* **30**, 2103-2115.
- Babich, H. and Stotsky, G.** (1985) Heavy metal toxicity in misroremediated ecological processes: A review and potential application to regulatory policies, *Envir.Res.* **36**, 11-137.
- Bitton, G. and Dutka, B.J.** (1986) Introduction and review of microbial and biochemical toxicity screening procedures, In: *Toxicity testing using Microorganisms*, Eds.: Bitto, G. and Dutka, J.) pp. 1-8. CRC Press, Florida
- Blok, J.A.** (1979) A repetitive die away test combining several biodegradability test procedures, *Int.Biodet. Bull* **1515**, 57-63.
- Brown, D. and Labouerur, P.** (1983) The degradation of dyestuffs: Part.I. Primary biodegradation under anaerobic conditions, *Chemosphere* **12**, 397.
- Cairns, J. and Pratt, R.** (1989) The scientific basic of bioassays, *Hydrobiologia* **188/189**, 5-20.
- Calow, P.** (1993) Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science Ltd.
- Cambel, A.B.** (1993) Applied Chaos Theory: A Paradigm for Complexity. Academic Press, Boston, MA.
- Dallinger, R. és Wieser, W.** (1977) The flow of copper through the terrestrial food chain. I. Copper and nutrition in isopods, *Oecologia* **30**, 253-264.
- Danielopol, D.L.** (1989) Groundwater fauna associated with riverine aquifers, *J. N. Am. Benthol. Soc.* **8**, 18-35.
- DECHEMA-Fachgesprache Umweltschutz** (1995) Bioassays for soil, In: 4th Report of the Interdisciplinary DECHEMA Committee „Environmental Biotechnology - Soil” and Ad hoc Committee „Methods for Toxicology/Ecotoxicological Assessment of Soils”, Eds.:Kreysa, G., Wiesner, J. DECHEMA, Frankfurt am Main
- DIN 38412** (1991) *Photobacterium phosphoreum* teszt, Német szabvány
- DIN 38412-33** (1987) *Scenedesus subspicatus* teszt talajkivonatok tesztelésére, Német szabvány
- EU-TGD** (1996) Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new and Notified Substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing Substances, EU, Brussels
- EC Council Directive 84/449/EEC** 25 April (1984), adopting to technical progress for the sixth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations, and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, Official Journal L133 Vol. 31 30-5-1988.

- EC Council Directive 79/831/EEC** Annex V. Part C. (1985) Methods for determination of ecotoxicity, Level I. C(II)4: Toxicity for earthworm, Artificial soil test, DG XI/128/82.
- ECETOC** (1988) Evaluation of Anaerobic Biodegradation, Technical Report 18. ECETOC, Brussels
- PHARE ECORISK Project** (1997) Ecological Risk of Organic and Inorganic Micropollutants on Danube Sediment, Second Phase Report
- Eijsackers, H.** (1978) Side effect of the herbicide 2,4,4-T affecting the isopod *Philoscia muscorum* Scopoli, *Zeitschr.Angew.Entomol.* **87**, 28-52.
- Ferrière G.; Fayolle, L. és Bouché, M.B.** (1981) Un nouvel outil, essential pour l'écophysologie et l'écotoxicologie: l'élevage des lombriciens en sol artificiel, *Pedobiologia* **22**, 196-201.
- Gearing, J. N.** (1989): The roles of aquatic microcosms in ecotoxicologic research as illustrated by large marine systems. In: *Ecotoxicology: Problems and Approache* Ed.: S. A. Levin, Springer verlag, Berlin, pp. 411-470,
- Giesy, J.P. and Graney, R.L.** (1989):Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators, *Hydrobiologia* **188/189**:21-60,
- Gill, J.E. és McNicoll, A.D.** (1991) Determination of the susceptibility of wild population of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) to the anticoagulant rodenticide brodifacoum, *Angew. Zool* **78**, 101-117.
- Green, J.; Bartels, C.; Warren-Hicks; W., Parkhust, B.; Linder, B.; Peterson, S. és Miller, W.** (1989) Protocols for short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, EPA/600/3-88/029. US EPA, Environmental Research Laboratory, Corvallis, Oregon
- Gruiz, K. and Vodicska, M.**(1992) Assessing Heavy Metal Contamination in Soil Using a Bacterial Biotest - In: Soil Decontamination Using Biological Processes; In: Proc. of an International Symposium, Karlsruhe, 6-9. December 1992, pp. 848- 855. Dechema, Frankfurt am Main
- Gruiz, K.** (1994) Bioassay to assess contaminated soil, In: Proceedings of the Second International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe. Budapest, p. 231-233
- Gruiz K., Horváth B. és Kriston É.** (1995/a) Talajtisztítási biotechnológiák I. – *Gazdaság és Gazdál kodás XXXIII* 1. 21-26.
- Gruiz K., Horváth B. és Kriston É.** (1995/b) Talajtisztítási biotechnológiák II. – *Gazdaság és Gazdál kodás XXXIII* 2. 15-18.
- Gruiz K.** (1997) Vegyi anyagok a környezetünkben – Ph. D. Értekezés
- Gruiz, K.; Molnár, M.; Szakács, T. and Bagó, T.** (1998a) New biological and Ecotoxicological Methods to Support Risk Assessment and Soil Remediation – In.: Contaminated Soil 98, pp. 1051-52, Thomas Telford, London
- Gruiz K.** (1998) A környezeti kockázat mérése – In: Veszélyes anyagok és készítmények (ed.: Kozák K.), pp. 201-259, Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó, Budapest
- Gruiz, K., Molnár, M., and Bagó, T.** (1999) Interactive bioassay for environmental risk assessment – In: Proc. Of SECOTOX'99, Munich, March 15-17.
- Gruiz,K., Molnár,M. and Szakács,T.** (1999) ATP content of whole soil: A new techniques for ecotoxicological testing – In: Proc. Of SECOTOX'99, Munich, March 15-17.

- Gruiz, K.; Murányi, A.; Molnár, M. and Horváth, B.** (1998b) Risk Assessment of Heavy Metal Contamination in Danube Sediment – J. of Water Sci. and Technol. **37**(6-7), 273-281.
- Haight, M.; Mudry, T. és Pasternak, J.** (1982) Toxicity of seven heavy metals on *Panagrellus silusiae*: the efficacy of the free living nematode as an in vivo toxicological bioassay, *Nematologica* **28**, 1-11.
- Holst, R.W. and Ellwanger, T.C.** (1982) Pesticide assessemnt Guidlines, Subdivision J. Hazard Evaluation Non-target plants, EPA-540/9-82-020, Office of Pesticides and Toxic substances. US EPA Washington, DC
- Hopkin, S.P.** (1990) Species-specific differences in the net assimilation of zinc, cadmium, lead, copper and iron by the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*, *J. Appl. Ecol.* **27**, 460-474.
- Horváth, B. and Gruiz, K.** (1994) Impacts of Metalliferous Ore Mining Activity on the Environment in Gyöngyösorszi, Hungary – Second Int. Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe, p. 157.
- Horváth, B.; Gruiz, K. and Sára, B.** (1996) Ecotoxicological Testing of Soil by Four Bacterial Biotests, *Toxicological and Environmental Chemistry* **58**, 223-235.
- Horváth, B. and Gruiz, K.** (1995) Ecotoxicological Testing of Contaminated Soil – Abstracts of the Fifth International KfK/TNO Conference on Contaminated Soil, 30 Oct.-3 Nov., Maastricht. p. 619-620.
- Horváth, B. and Gruiz, K.** (1996) Impacts of metalliferous ore mining activity on the environment, *Sci.Total Environ.* **184**, 215-227.
- Iglisch, I.** (1986) Hinweise zur Entwicklung von testverfahren zum Nachweis subakuter Wirkungen von Chemicalien, *Angew.Zool.* **2**, 199-218.
- International Office of Standardisation (ISO)** (1987) Watet Quality – Algal Growth Inhibition Test, NO. 8692. ISO, Paris
- International Office of Standardisation (ISO/TC 190SC4 WG2)**, Soil Quality – Effects of Soil pollutant on Collembola (*Folsomia candida*) – Method for determination of effects on reproduction
- International Office of Standardisation (ISO)** No. 9509 – Method for assessing the inhibition of activated sludge micro-organisms by chemicals and waste waters
- Jorgensen, S.E.; Halling-Sorensen, B. and Mahler, H.** (1998) Estimation Methods in Ecotoxicology and Environmental Chemistry, Lewish Publ., Boca Raton, Boston, London, New York
- Kenaga, E.E.** (1982) Predictibility of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates, *Environ.Toxicol.Chem.* **1**, 347-358.
- Kwan, K.K. and Dutka, B.J.** (1990) Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays, *Tox.Assess.* **5**, 395-404.
- Landis, W.G. and Yu, M.H.** (1999) Introduction to Environmental Toxicology: impact of chemicals upon ecological systems, CRC Press LLC, New York, Boca Raton, Florida
- Legault, R.; Blaise, C.; Rokosh, D. and Chong-Kit, R.** (1994) Comparative assessment of the SOS Chormotest Kit and the Mutatox Test with the *Salmonella* Plate Incorporation (Ames) and Fluctuation Tests for Screening Genotoxic Agents, *Environ. Toxicol. Water Qual.* **9**, 45-57.

- Liu, D. and Dutka, J.B.** (1984) Toxicity Screening procedures using bacterial systems, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
- Mayer, F.L.; Mayer, K.S. and Ellersiech, M.R.** (1986) Relation of survival to other endpoints in chronic toxicity tests with fish *Environ, Toxicol, Chem.* **5**, 737-748.
- Mola, L.; Sabatini, M.A.; Fratello, B. and Bertolani, R.** (1987) Effects of antrazine on two species of Colembolla (*Onychiuridae*) in laboratory tests, *Pedobiologia.* **30**, 145-4-149.
- MSZ-081721/1-86** (1986) Szennyvízzel, szennyvíziszappal kezelt mezőgazdasági-lag hasznosított területek talajvizsgálata, Talajtoxicitás vizsgálat *Azotobacteres* talajblokk módszerrel, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ21978/2-86** (1986) Veszélyes Hulladékok vizsgálata, Algateszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ 21987/30** (1988) Veszélyes hulladékok vizsgálata, *Azotobacter agile* teszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ 22902/1-76** (1989) Víztoxikológia vizsgálatok, Általános előírások, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ22902/2** (1989) Víztoxikológia vizsgálatok, Algateszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ22902-3** (1991) Víztoxikológia vizsgálatok, Statikus halteszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ 22902-6** (1991) Víztoxikológia vizsgálatok, Daphnia teszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ21470-88** (1993) Környezetvédelmi talajvizsgálatok, *Pseudomonas fluorescens* talajtoxicitás teszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- MSZ21976-17** (1993) Települési szilárd hulladék vizsgálata, Csiranövényteszt, Magyar Szabványügyi Hivatal
- Murányi, A. and Gruiz, K.** (1997) Chemical and Ecological Risk of Heavy Metals in Danube Sediment, Report, Phare, TDQM Project No. H 9305-02/1111
- Odum, E.P. és Biever, L.J.** (1984) Resource quality, mutualism, and energy partitioning in food chains, *Am.Nat.* **124**, 360-376.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)** (1981) Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Degradation and Accumulation, OECD, Paris
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)** (1984) OECD Guidelines for Testing of chemicals, Guideline 208 Terrestrial Plant Growth Test OECD, Paris, France
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)** (1984) OECD Guidelines for Testing of chemicals, Guideline 207, Earthworm acute toxicity tests, OECD, Paris, France
- Pedersen, F.; Damborg, A. and Kristensen, P.** (1995) Miljøprojekt 289. Guidance Document for Risk Assessment of Industrial Waste Water, Ministry of Environment and Energy, Denmark
- Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, D.A.** (1993) Microbiology, Wm.C.Brown Publishers, United States of America

- Riepert, F. and Kula, Ch.** (1996) Development of Laboratory Methods for Testing effects of Chemicals and Pesticides on Collembola and Earthworms, Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Parey Buchverlag Berlin-Dahlem
- Rönnpapel, K.; Liß, W. and Ahlf, W.** (1995) Microbial bioassay to assess the toxicity of soil associated contaminants, *Ecotox. Environ. Saf.* 31.
- Sauvent, M.P.; Pepin, D. and Piccini, E.** (1999) *Tetrahymena pyriformis*: A tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere*, **38**, 1631-1669.
- Sellner, M.** (1993) The use of bioassays for contaminated soil investigations, In: Cont. Soil '93, pp. 649-655. Eds.: van den Brink, W.J., Bosman, R., Arendt, F, Kluwer Academic Publ., Dordrecht
- Sloof, W. and Canton, J.H.** (1983) Comparison of the susceptibility of 11 freshwater species to 8 chemical compounds. II. Semi-chronic toxicity tests, *Aquat. Toxicol.* **4**, 271-282.
- Somerville, L., and Greaves, M.P.** (1987) Pesticide effects on soil microflora, Taylor and Francis, London
- Spellerberg, I.F.** (1991) Monitoring Ecological Change, Cambridge University Press, Cambridge
- Sturhan, D.** (1986) Influence of heavy metals and other elements on soil nematodes, *Rev. Nématol.* **9**, 311.
- Subagja, J. and Snider, R.J.** (1981) The side effect of herbicide atrazine and paraquat upon *Folsomia candida* and *Tullbergia granulata* (Insecta, Collembola), *Pedobiologia* **22**, 141-152.
- Suter, G.** (1989) Ecological end-point, In: Ecological Assessment of Hazardous Waste Site: Field and Lab Reference Document (Eds.: W. Waren-Hicks, B.R. Parkhurst and S.S. Baker), EPA 600/3-89/013. US EPA, Corvallis, OR
- Tomlin, A.D.** (1977) Toxicity of soil applications of the fungicide benomyl, and two analogues to three species of Colembolla, *Can. Entomol.* **109**, 1619-1620.
- Torslov, J.** (1993) Comparison of bacterial toxicity tests based on growth, dehydrogenase activity, and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*, *Ecotox. Environ. Safety* **25**, 33-40.
- Torslov, J.; Samsøe-Petersen, L.; Rasmussen, J.O. and Kristensen, P.** (1997) Use of Waste Products in Agriculture, Miljøprojekt Nr. 366, Danish EPA
- Torstensson, L.** (ed.) (1994) Soil Biological Variables in Environmental Hazard Assessment – Guidelines MATS, Swedish EPA
- US-EPA 600/3-88-029** (1989) Protocol for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites A.8.6. Lettuce seed germination (*Lectuca sativa*)
- US Environmental Protection Agency (EPA)** (1985) Toxic substance control act test guidelines environmental effects testing guidelines, 40 CFR Part 797. Fed Reg. 50 (188), 39389
- US Food and Drug Administration** (1987) Seed germination and root elongation In Environmental Assessment Technical Handbook, 4.06.0, Center for food safety and Applied Nutrition, Center for Veterinary Medicine, Washington DC
- Van Cappelleveen, H.E.** (1995) Risk Assessment for Nature development on Polluted Soils, In: Contaminated Soil '95 pp. 603-604. Eds.: van den Brink, W.J., Bosman, R., Arendt, F., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

- Van Gestel, C.A.M.; van Dis, W.A.; van Breemen, E.M. and Sparenburg, P.M.** (1989) Development of standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia fetida andrei* using copper, pentachlorophenol and 2,4-dichloroaniline, *Ecotox. Environ. Safety*, **18**, 305-312.
- Van Kessel, W.H.M.; Brocades Zaalberg, R.W. and Seinen, W.** (1989) Testing environmental pollutants on soil organisms: A simple assay to investigate the toxicity of environmental pollutants on soil organisms using cadmium chloride and nematodes, *Ecotox. Environ. Safety*, **18**, 181-190.
- Van Straalen, N.M.; Schobben, J.H.M. and Goede, R.G.** (1989) Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods, *Ecotox. Environ. Safety*, **17**, 190-204.
- Vargha B.** (1991) Az ökotoxikológiai vizsgálatok jelentősége és javasolt fejlesztési irányai a környezetegészségügy területén, *Egészségtudomány* **35**, 99-111.
- Vargha B.** (1995) Személyes konzultáció, OKI, Budapest.
- Xu, H. and Dutka, B.J.** (1987) ATP-TOX System -A new, rapid, sensitive bacterial toxicity screening system based on determination of ATP, *Tox. Assess.* **2**, 149-166.
- Xu, H.; Dutka, B.J. and Kwan, K.K.** (1987) Genotoxicity studies on sediments using modified SOS Chromotest, *Tox. Assess.* **2**, 79-87.

Előszó	4
1. Környezettoxikológia és kockázatkezelés	5
1.1. Vegyi anyagok hatása a környezetre	5
1.1.1. A környezettoxikológia alapjai	8
1.1.2. Az ökoszisztémák komplexitása, a vegyi anyagok ökológiai kockázata	10
1.2. Toxicitási tesztek, toxikus anyagok hatása	12
1.2.1. Dózis-válasz és koncentráció-válasz összefüggés	14
1.2.1.1. A koncentráció – válasz összefüggés.....	15
1.2.1.2. Akut toxicitás.....	16
1.2.1.3. Krónikus toxicitás	17
1.2.2. Toxicitási tesztek osztályozása	19
1.2.3. Ökotoxikológiai tesztek tervezése	20
1.2.3.1. Egy fajt alkalmazó tesztek	21
1.2.3.2. Több fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek tervezése	23
1.3. Általánosan használt teszt módszerek.....	24
1.3.1. <i>Daphnia</i> , 48 órás akut teszt	25
1.3.2. <i>Daphnia</i> , krónikus teszt	26
1.3.3. Alga növekedési teszt	27
1.3.4. Haltesztek	29
1.3.5. Teratogenitás vizsgálata békaembrióval (FETAX)	30
1.3.6. Több fajt alkalmazó mikrokozmosz és mezokozmosz tesztek	31
1.3.6.1. Standard vízi mikrokozmosz	32
1.3.6.2. Kevert vízi mikrokozmosz.....	33
1.3.6.2. Szabadtéri mikrokozmosz peszticidek tesztelésére (FIFRA)....	33
1.3.6.4. Talaj-mikrokozmosz	35
2. Ökotoxikológia és a vegyi anyagok kockázata	36
2.1. A környezeti kockázat	36
2.1.1. Vegyi anyagok kockázatának számszerű jellemzése	37
2.1.2. A vegyi anyagok általános és helyspecifikus kockázata	38
2.2. A kockázat mérésének alapja.....	39
2.2.1. A környezet kitettsége, a PEC érték meghatározása	40
2.2.2. A koncentráció – válasz összefüggés	41
2.2.2.1. Az emberre károsan nem ható koncentráció	42
2.2.2.2. Az átlagos napi dózis, vagyis a kitettség meghatározása	42
2.2.2.3. Az ökoszisztémára károsan nem ható koncentráció, PNEC	43
2.2.2.4. Az ökológiai kockázat pontosítása, iterációs megközelítés	45
2.2.2.5. A bioakkumuláció.....	47
2.3. Vegyi anyagok általános kockázatfelmérése, határértékképzés.....	48
2.3.1. A trifluralin kockázata a Duna ökoszisztémájára	49
2.4. Szennyezett területek kockázata és egyedi határértéke.....	54

2.4.1. Az integrált kockázati modell	54
2.4.2. A helyspecifikus kockázat mennyiségi felmérése	57
2.4.3. Kockázatos anyagok keverékeinek környezeti kockázata	57
2.4.4. A remediáció célértéke (D)	58
2.4.5. Többféle szennyezőanyaggal szennyezett terület kockázata	59
2.4.6. Régi, elhanyagolt szennyezett terület kockázata és célértéke	60
2.5. Szennyezett területek állapotfelmérése és monitoringja	60
2.6. Környezetirányítási döntések ökotoxikológiai eredmények alapján	62
3. Szennyezett talajok ökotoxikológiai jellemzése	67
3.1. Általános áttekintés	67
3.1.1. A talaj ökotoxikológiai tesztelésére alkalmas megoldások	69
3.1.1.1. Szennyezett talaj ökotoxikológiai eredményének felhasználása	70
3.1.1.2. Az ökotoxikológiai módszerek előnyei és hátrányai	71
3.1.1.3. A környezeti problémához illeszkedő ökotoxikológiai teszt	72
3.2. A talajökoszisztéma tagjai és szerepük	73
3.3. Talajtesztek módszertani áttekintése	76
3.3.1. Egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek	76
3.3.2. Akut és krónikus tesztek	78
3.3.3. Több fajt alkalmazó tesztek	79
3.4. Talajtesztek fajtái	80
3.4.1. Egy fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek	81
3.4.1.1. Bakteriális tesztek	81
3.4.1.2. Növényi tesztek	81
3.4.1.3. Állati tesztorganizmust alkalmazó módszerek	84
Földgiliszta tesztek.....	84
Egyéb állati tesztorganizmusok.....	86
3.4.2. A talaj saját aktivitásainak mérése mikrokozmoszban	86
3.4.2.1. Biodegradációs tesztek, szénanyagcsere vizsgálatok	87
CO ₂ -termelés és az O ₂ -felvétel mérése	89
Mineralizáció követése ¹⁴ C jelzett szubsztrátokkal	89
Biodegradálhatóság, felezési idők, sebességi állandók	92
Az oxigén felvételén alapuló módszerek.....	93
Anaerob biodegradációs tesztek.....	94
3.4.2.2. Nitrogénanyagcsere vizsgálatok	95
3.4.2.3. Talajenzimek aktivitásának vizsgálata	96
3.4.2.4. A talaj teljes ATP tartalmának meghatározása.....	96
3.4.2.5. Rezisztencia vizsgálatok	97
3.4.3. Ökoszisztéma biomonitoring és szabadföldi tesztek	98
3.4.4. Bioszenzorok, biopróbák	99
3.4.5. Szennyezett területek jellemzése	100
3.4.5.1. Fajeloszlás.....	103
3.4.5.2. Biodegradáció	104
3.4.5.3. Rezisztencia.....	105
3.4.5.4. Bioakkumuláció	105
3.5. Géntechnikák az ökotoxikológiában	106

3.5.1. Speciális gének kimutatása hibridizációs próbával	106
3.5.2. Speciális gének kimutatása PCR segítségével	106
3.5.3. Speciális gének kimutatása a géntermék alapján	106
4. Talajökotoxikológiai módszerek leírása	107
4.1. Egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek	107
4.1.1. Bakteriális biotesztek	107
4.1.1.1. <i>Vibrio fischeri</i> lumineszcencia-gátlása	108
Folyadék fázisú minták tesztelése <i>Photobacterium phosphoreum</i> mal	109
Szilárd fázisú minták vizsgálata <i>Photobacterium phosphoreum</i> mal ...	111
4.1.1.2. <i>Bacillus subtilis</i> teszt, agardiffúziós módszerrel.....	115
4.1.1.3. <i>Azotobacter agile</i> tesztorganizmus dehidrogenáz aktivitása	117
4.1.2. <i>Protozoa</i> tesztek	118
4.1.2.1. Toxicitás vizsgálat <i>Colpoda steinii</i> tesztorganizmussal	119
4.1.2.2. Toxicitás vizsgálat <i>Tetrahymena pyriformis</i> tesztorganizmussal	121
4.1.3. Növényi ökötoxikológiai tesztek	123
4.1.3.1. Fehér mustár csírázásgátlás, gyökér-, és szárnövekedési teszt	123
4.1.3.2. Kerti zsáza szár- és gyökernövekedés-gátlási teszt	125
4.1.4. <i>Collembola (Folsomia candida)</i> teszt	126
4.1.5. Földgiliszta (<i>Eisenia fetida</i>) teszt	129
4.2. Talaj saját aktivitásainak felhasználása ökötoxikológiai jellemzésre ...	130
4.2.1. Aerob heterotróf sejtszám mérése tenyésztéses technikákkal	131
4.2.2. Szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározásal	132
4.2.3. Talajlégzés mérése a termelt CO ₂ alapján	134
4.3. Egészséges talaj mint tesztorganizmus	139
4.3.1. A talaj nitrifikációja	139
4.3.2. A talaj ATP tartalma	143
4.4. Mikrokozmosz kísérletek bioremediáció követésére	145
4.4.1. Fémmel szennyezett talajok vizsgálata	145
4.4.1.1. A fémkioldás vizsgálata.....	145
4.4.1.2. Toxikus fémmel szennyezett talajokban végbemenő feltáródás	146
.....	146
4.4.2. Mikrokozmosz kísérletek szerves anyagokkal szennyezett talajokkal	147
4.4.2.1. A mikrokozmosz alkalmazási területei	148
Irodalomjegyzék	150

A vegyi anyagok a környezetünkre leselkedő veszélyek között az első helyen állnak. Gyártásuk és használatuk során kikerülnek a környezetbe, a levegőbe, a vízbe és a talajba, ahol az ökoszisztéma élőlényeivel vagy az emberrel találkozva lehetőségük nyílik káros hatásuk kifejtésére. Hogy ezek a hatások milyen mértékben veszélyeztetik az ökoszisztéma tagjait, valamint a területet használó embereket, gyermekeket, azt nehéz mérni. Márpedig, amíg a szennyezőanyag vagy a szennyezett terület kockázata nincs számszerűsítve, addig nem lehet jól dönteni a teendőkről és azok sürgősségéről.

A környezettoxikológia célja a vegyi anyagok káros hatásának, veszélyességének megítélése, kockázatának számszerűsítése, méghozzá úgy, hogy a veszélyeztetett ökoszisztémával vagy az emberrel nem kísérletezhetünk, nem mérhetjük meg rajtuk azt a küszöbértéket, amely alatt a veszélyes anyag ártalmatlan. Tehát olyan tesztorganizmusokat kell találnunk, melyek válaszból következtetünk a teljes ökoszisztémára vagy az emberre. Ahhoz, hogy ez a következtetés helyes legyen, megbízható, szabványosított mérési és adatértékelési módszerekre van szükségünk és adatbázisokban hozzáférhető információkra a vegyi anyagokról, a környezetről, az ökoszisztémáról és az emberről, valamint mindezek lehetséges kölcsönhatásairól.

Ennek az előttünk álló hatalmas feladatnak a megoldásához szolgál eszközzül a környezettoxikológia.

65036

