

Állati mikrobiotesztek szennyezett talajokra

**Bózvári Eszter és Gruiz Katalin:
Új állati tesztek a kockázati scenáriók
modellezésére**

Kísérletek

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1 <i>A vegyi anyagok káros hatásai, az ökoszisztéma veszélyeztetettsége</i>	5
2.1.1 A toxicitás problémája	5
2.1.2 Ökotoxikológiai tesztek.....	6
2.1.3 Az eredmények megbízhatóságát befolyásoló tényezők	11
2.1.4 Az ökotoxikológiai vizsgálat végpontja	12
2.2 <i>A talaj</i>	14
2.2.1 A talaj jellemzői	14
2.2.2 A talaj szerepe	14
2.2.3 A talaj keletkezése és pusztulása.....	15
2.2.4 A talaj felépítése.....	16
3. Anyagok és módszerek	22
3.1 <i>Collembola teszt</i>	22
3.1.1 Akut vizsgálat kivitelezése.....	23
3.1.2 Az akut vizsgálat kiértékelése	23
3.2 <i>Tetrahymena pyriformis reprodukciógátlás teszt</i>	24
3.2.1 A teszt ismertetése.....	24
3.2.2 A teszt kiértékelése	25
3.2.3 Módszerfejlesztés	27
3.3 <i>Daphnia-teszt</i>	27
3.3.1 Általános teszt kivitelezése	28
3.3.2 Módszerfejlesztés	29
3.4 <i>A kísérleteim során felhasznált anyagok</i>	31
3.4.1 Vizsgált talajok.....	31
3.4.2 A tesztekhez felhasznált adalékok, tápoldatok	32
3.4.3 A tesztekhez felhasznált szennyező anyagok	33
4. Talajra alkalmas ökotoxikológiai módszerek fejlesztése	40
4.1 <i>A talaj, mint élőhely szennyezettségének jellemzése toxicitási tesztekkel</i>	42
4.1.1 Diesel olajjal szennyezett talaj hatása a Collembola túlélésére.....	42
4.1.2 Fenantrénnel szennyezett talaj hatása a Collembola túlélésére	44
4.1.3 Cypermetrinnel szennyezett talaj hatása a Collembollára	46
4.1.4 Diesel olajjal szennyezett talaj hatása Tetrahymena pyriformisra.....	48
4.1.5 Fenantrénnel szennyezett talaj hatása a Tetrahymena pyriformisra	51
4.1.6 Cypermetrinnel szennyezett talaj hatása Tetrahymena pyriformisra.....	52
4.1.7 Összefoglaló értékelés a Tetrahymena tesztorganizmusról.....	54
4.2 <i>A szennyezett talaj kockázata felszín alatti vizekre</i>	55
4.2.1 Tetrahymena pyriformis érzékenysége Diesel olajjal szennyezett talaj vizes kivonatára	55
4.2.2 Tetrahymena pyriformis érzékenysége fenantrénnel szennyezett talaj vizes kivonatára	58
4.2.3 Tetrahymena pyriformis érzékenysége cypermetrinnel szennyezett talaj vizes kivonatára	62
4.2.4 Tetrahymena alkalmassága szennyezett talajok vizes kivonatának vizsgálatára.....	64
4.3 <i>Szennyezett talajból eredő felszíni víz szennyezettség jellemzése bioteszttel</i>	65
4.3.1 Daphnia érzékenysége Diesel olajjal szennyezett talaj vizes kivonatára	66
4.3.2 Daphnia érzékenysége fenantrénnel szennyezett talaj vizes kivonatára	67
4.3.3 Daphnia érzékenysége cypermetrinnel szennyezett talaj vizes kivonatára.....	69
4.3.4 Daphnia felhasználása szennyezett talaj kockázatának értékelésére.....	70
4.4 <i>Összefoglaló értékelés a tesztekéről és a tesztorganizmusokról</i>	71
4.4.1 A scenáriók összehasonlítása	71
4.4.2 Az általam tesztelt szennyezőanyagokra vonatkozó érzékenység összehasonlító vizsgálata.....	74

5. Összefoglalás.....	77
6. Irodalomjegyzék.....	81

1. Bevezetés

A talaj ökoszisztémája biztosítja a szárazföldi ökoszisztémákban az elemek geobiokémiai ciklusát, a talaj funkciójának teljesülését. A talaj ökoszisztéma összetétele rendkívül bonyolult, a biota igen érzékeny reagál minden külső hatásra, például a szennyezettségre. A talaj állapota, a biota egészsége a talaj fizikai, kémiai és biológiai paramétereinek és ezen jellemzők kölcsönhatásának függvénye. A szennyezett talajnál még bonyolultabb a rendszer, hiszen az eredeti bonyolult mátrixhoz és kölcsönhatásokhoz hozzáadódik a szennyezőanyag és annak kölcsönhatásai a talajmátrixszal, egymással és a biota egyes tagjaival. Ezen jellemzők és kölcsönhatások ökoszisztémára gyakorolt befolyásának előrejelzése csak a hatások vizsgálatának integrálásával oldható meg, fizikai és kémiai jellemzők önmagukban nem, csak a biológiai válaszokkal együtt képesek jellemezni a talaj állapotát, a szennyezettség kockázatát.

Ahhoz, hogy a talaj, – mint élőhely és a szárazföldi ökoszisztéma alapvető eleme – jellemzését minél teljesebb körben meg tudjuk valósítani új típusú biológiai teszt módszerekre van szükségünk, olyanokra, melyek magukba foglalják az említett kölcsönhatásokat, a szennyező vegyi anyagok szinergetikus vagy antagonisztikus hatását, a talaj szilárd anyagának mátrixhatását és a biota és a szennyezőanyagok kölcsönhatásait. Ez csak olyan teszt együttesekkel érhető el, amelyek a teljes talajt vizsgálják, vagyis mindhárom fázisát (levegő, víz, szilárd), biztosítják a kölcsönhatást a talaj és a tesztorganizmus között (közvetlen érintkezés) és egyszerűek, gyorsak és nem költségesek.

Munkám célja, hogy a talaj szennyezettségével összefüggő állapotát állati tesztorganizmusok segítségével jellemezzem. Az állati tesztorganizmust alkalmazó biológiai módszerek kevésbé fejlődtek ki, annak ellenére, hogy az állatok a talaj ökoszisztéma fontos tagjai és a vegyi anyagok környezeti kockázatának mennyiségi meghatározásához is elengedhetetlen az ő válaszuknak figyelembevétele.

Ilyen módszerek átdolgozásában vettem részt azzal, hogy 3 állati tesztorganizmust és a talaj saját komplex aktivitásának válaszát mértem ki három eltérő szerves szennyezőanyaggal szennyezett talaj esetében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A vegyi anyagok káros hatásai, az ökoszisztéma veszélyeztetettsége

Az ökotoxikológia vegyi anyagok ökoszisztémára gyakorolt káros hatását vizsgálja különböző ökológiai szintű és eltérő elveken alapuló módszerekkel. A vegyi anyagok veszélyességét, az általános kockázatot nem konkrét, hanem fiktív környezetre vonatkoztatjuk. Az ökotoxikológiai tesztek eredményeiből extrapolálással kapjuk meg az egész ökoszisztémára érvényes eredményt.

A környezettoxikológia célja a vegyi anyagoknak az ökoszisztémára és az emberre gyakorolt hatásai alapján a környezetben előforduló szennyező anyagoknak azon koncentrációjának – a koncentráció küszöbértékének megállapítása, amely még nem hat károsan a vizsgált ökológiai szinten (az előrejelzés alapján károsan még nem ható koncentráció: Predicted No Effect Concentration, PNEC), ezáltal a vegyi anyagok környezeti kockázatának megállapításához szükséges mérőszámok (határértékek) megállapítása. Ebben az esetben fiktív általános környezetre vonatkoztatunk, és általános kockázatot határozunk meg.

Szennyezett területek állapotfelmérése, monitoringja, és kockázatának (az előre jelezhető kár) meghatározása esetén konkrét szennyezett területhez kötődő hatást, ebből extrapolálható károsan még nem ható koncentráció értékeket, majd helyspecifikus kockázatot határozunk meg.

2.1.1 A toxicitás problémája

Toxikusnak tekintünk egy anyagot (kémiai elemet, vegyületeit, szerves anyagot), amennyiben káros hatást fejt ki a környezetre, növényre, állatra, emberre.

Számos ásványi elem nélkülözhetetlen vagy legalábbis előnyös élettani hatású, de mérgezővé vagy károssá válik túlsúlya esetén. A károsság tehát az adag, a terhelés, ill. a koncentráció függvénye. Mértékét a fajlagos, azaz egységnyi koncentrációra eső negatív hatással (terméscsökkenés, megbetegedés) mérhetjük, a gyakorlatban speciális mutatószámok segítségével (pl.: LD₅₀, ED₅₀). Ez a hatás nem független azonban a környezetben előforduló más anyagok, kémiai elemek jelenlététől vagy hiányától, a lehetséges kölcsönhatásoktól.

A szennyező anyagok hatása függ az expozíciós időtől is. A rendszeres, tartós, kis adagú terhelés alattomosabb lehet, mert nehezebben észrevehető az akkumuláció.

A növekvő terhelés krónikus zavarokat, míg az egyszeri nagy adag akut megbetegedést, a letális dózis pedig pusztulást okozhat a szervezetben. Másként jelentkezik a károsodás a fejlődés különböző stádiumaiban, eltérhet nemenként, fajonként, egyedenként.

Fontos lehet, hogy a káros anyag milyen formában található. A metil-higany vegyületek erős mérgek, míg a HgS oldhatatlan semleges anyag. Hasonlóképpen a Ba oldható vegyületei mérgezőek, míg szulfáttal képzett sóját kontrasztanyagként használják a gyomor röntgen-vizsgálatainál. Meghatározó lehet az ionos állapot, az oxidációs fok. A Cr(III) vegyületek nem mérgezőek, míg a Cr(VI) erős mérgező és rákkeltő. Megemlítendő, hogy egyes források szerint a Cr(III) vegyületek bizonyos talajokban oxidálódhatnak és idővel mérgezővé válhatnak. Hasonló a helyzet az As(III) és As(V) ionokkal, utóbbiak mérgezőek.

Humán szempontból lényeges a szervezetbe kerülés, ill. a felvétel módja. Legveszélyesebb az injektálás (közvetlen véráramba jutás), ezt követheti az emésztőrendszerbe, tüdőbe kerülés, a belélegzés. Fontos az emészthetőség, hiszen az élelmiszerekből bizonyos anyagok 100 %-ban felszívódhatnak, míg mások a vizelettel és a bélsárral gyorsan kiürülnek a szervezetből káros következmények nélkül.

Összefoglalva megállapítható, hogy a toxicitás problémája rendkívül összetett. A mérgező vagy káros hatás függhet számos tényezőtől, mint a koncentráció, ionállapot vagy oxidációs fok, expozíciós idő, vegyület formája, fizikai eloszlás és fajlagos felület, a rendszerben előforduló más anyagok jelenléte és azokkal való kölcsönhatás, az élő szervezettel történő érintkezés módja és a bejutás körülményei (felületre, táplálékba, közvetlenül vérbe vagy tüdőbe). A környezeti feltételek módosítják a hatást, melyet a toxicitási határkoncentrációk megállapításánál nem tudunk kellően figyelembe venni. A megadott határértékek ebből adódóan viszonylagosak, relatívak. Nem kevésbé meghatározó természetesen az egyéni szervezet kondíciói, genetikai adottsága, ellenálló képessége stb.

(Kádár, 1998)

2.1.2 Ökotoxikológiai tesztek

Az ökotoxikológiai vizsgálatok célja, hogy viszonylag egyszerű biológiai tesztekkel az ökoszisztéma egészére kivetíthető eredményt kapjunk. Mind egyes vegyi anyagok, mind szennyezett környezeti minták élő szervezetekre gyakorolt hatása vizsgálható ökotoxikológiai tesztekkel. Az eredmények képezik a kockázatfelméréshez szükséges, az ökoszisztémát nem károsító koncentráció (Predicted No Effect Concentration, PNEC) érték alapját.

Az ökotoxikológiai tesztek közvetlenül mutatják a környezet, vagy a környezeti minták aktuális toxicitását és egyéb káros hatásait.

Az ökotoxikológiai eredmény magában foglalja a környezeti mintában található, különféle módokon és erősséggel kötődő szennyezőanyagok hozzáférhetőségét. Vegyes szennyeződés esetében a hatások eredőjét mutatja, melyben az egymást erősítő, összeadódó és kioltó hatások egyaránt megjelennek. Ismeretlen összetételű anyagok hatása is mérhető. Területek környezeti állapotfelmérése során megmutatja az előre nem látott, a vizsgálati tervbe be nem vett, fizikai-kémiai módszerekkel nem vizsgált szennyezők hatását is.

Az ökotoxikológiai eredmények összevetése a fizikai-kémiai vizsgálatok eredményeivel lehetővé teszi az ún. kémiai időzített bomba jelenségének tanulmányozását. Azt, hogy jellemző módon a szilárd fázisú, nagy megkötő kapacitással rendelkező környezeti elemekben, vagyis a talajban, és az üledékben felhalmozódott, de az adott körülmények között az erős kötődés, azaz fizikai, kémiai és biológiai szempontból hozzáférhetetlen forma miatt toxikus hatást nem mutató mintáknak mekkora a kockázata, milyen mérvű változás hatására és milyen valószínűséggel történhet meg az addig hatást nem mutató toxikus anyagok felszabadulása és jelentkezhethet káros hatásuk.

A szennyező anyagok egymással, a szennyezőanyag keverékeknek a mátrixszal és az ökoszisztéma tagjaival alakuló kölcsönhatásai összetettek. Ezért van különösen nagy jelentőségük az ökotoxikológiai vizsgálatoknak, mert a tesztorganizmusok jól megválasztott együttese és a mérési rendszer képes az aktuális toxicitást mérni a környezeti mintákban, akkor is jelet adva, ha kémiailag nem mérhető, vagy monitorozáshoz ki nem választott szennyező anyagról van szó.

2.1.2.1 Az ökotoxikológiai tesztek fajtái

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 **kémiai** analitikai módszerek a talajban található szennyezőanyagok feltárás után mérhető koncentrációját mérik, 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-, agyagtartalom, pH, redox viszonyok).

A **biológiai** módszerek közül a leggyakrabban a biokémiai eljárásokat, vagy élőlény-teszteket alkalmaznak:

- A biokémiai eljárások többségénél ismert enzimek vagy enzimrendszerek aktivitásának gátlásával mérik a mérgező anyag mennyiségét.
- Különböző rendszertani csoportokba tartozó élőlények, izolált szervek vagy természetes állományok valamilyen válaszreakcióját vizsgálják a mérgezőanyag változó koncentrációjának hatására.

A teszt módszerek a vizsgálat időtartamától függően rövidlejárátú (akut) vagy hosszantartó (krónikus) eljárások lehetnek:

- Akut: időtartama a tesztorganizmus élettartamánál sokkal rövidebb és eredménye alapján csak a mérgezés akut hatása állapítható meg. Az esetek 88%-ában, ha a szennyezőanyag rendelkezik akut toxicitással, akkor krónikus hatása is kimutatható.
- Krónikus: időtartama a tesztorganizmus élettartamánál min. 1,5-szer hosszabb. A kísérlet időtartama alatt élettani, Alaktani, szaporodás- vagy táplálkozásbiológiai vizsgálatok eredményei alapján állapítják meg a mérgező anyag hatását. Az alkalmazott koncentrációk általában kisebbek, mint az akut tesztek esetében használtak.

A biológiai tesztek külön csoportját képezik a mutagén és karcinogén hatások kimutatására kidolgozott módszerek:

- A mutagenézis a DNS szerkezetében bekövetkező öröklődő változás, amely az anyagcsere-élettani folyamatok káros, olykor az élőlény pusztulását okozó változásait okozza.
- A karcinogenezis rosszindulatú daganatokat indukáló hatás, amely a sejtszaporodás szabályozatlansága által a szövetekben vagy szervekben irreverzibilis és progresszív károsodást okoz.

A biológiai módszerek előnye, hogy 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 és akkumuláló természetű, különösen a fejlettebb biológiai szervezetek esetén. Ez a szükséges mérések számának csökkentéséhez vezethet mind térben, mind a mérések gyakoriságában.

A biológiai hatás mérésének hátránya, hogy gyakran nehéz a megfigyelt hatást a szennyeződés specifikus vonásaival összekapcsolni.

A jelenlegi kémia-orientált szennyeződés csökkentési irányelvek és a kémia-specifikus problémák feltárása tekintetében nyilvánvaló, hogy a biológiai hatás mérése soha sem fogja teljes mértékben helyettesíteni a kémiai analízist, hanem azzal együtt, azt kiegészítve szolgáltat információt. (Fleit, 1989)

2.1.2.2 Az ökotoxikológiai tesztek alkalmazása talajra

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 tesztelésre használt organizmus kiválasztását körültekintően kell végezni, hogy a kapott eredmény alapján következtetéseket vonhassunk le a magasabb trofikus szinten élőkre.

A különböző trofikus szinteket jellemző tesztek

1. Bakteriális tesztek

A szennyezőanyagok vizsgálatára széles körben használják a bakteriális bioteszteket. Ezek jelentősége az utóbbi időben megnövekedett.

Elterjedésüket és népszerűségüket annak köszönhetik, hogy gyorsak és laboratóriumi körülmények között könnyen kezelhetők valamint jól reprezentálják a legtöbb ökoszisztémát.

A bakteriális biotesztek a magyar szabványok között is megtalálhatók: az *Azotobacter agile* teszt hulladék-kivonatok vizsgálatára (MSZ 21978/30-1988), a *Pseudomonas fluorescens* teszt talaj-kivonatok biotesztelésére (MSZ 21470-88), és az *Azotobacter chroococcum* talajblokk vizsgálatokra (MSZ 08-1721/1-86) alkalmas.

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

A DIN 38412 német szabvány a lumineszcens *Photobacterium phosphoreum*ot alkalmazza tesztelésre.

2. Növényi tesztek

A növényi tesztek esetében is érdemes megkülönböztetni az egysejtű növényeket, vagyis algákat alkalmazó teszteket a magasabb rendűekkel kidolgozott teszteltől.

Algatesztek: Az algák használata ökotoxikológiai vizsgálatokra általánosan elterjedt a világon, talajok esetén azonban csak a talajkivonat tesztelhető velük.

Magasabb rendű növényi tesztorganizmusok: A magasabb rendű növényekkel végzett toxicitás tesztek végpontja a *pusztulás*, a *növekedés* (mérhető hosszban, súlyban, %-os takarásban) valamint a *fotoszintetikus* és a *metabolikus enzim aktivitások* lehetnek

A tesztelésre használt növényeket úgy választják ki, hogy laboratóriumi körülmények között könnyen kezelhetőek legyen. A szabványok többnyire egynyári növényeket és fűféléket javasolnak.

Csírázásgátlás 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.

3. Állati tesztek

Számos, **egysejtű és többsejtű állatot** alkalmazó ökotoxikológiai teszt található az irodalomban. Ezek közül legszélesebb körben használt tesztorganizmus a földigilisza, az *Eisenia fetida*.

Földigilisza tesztek

Az akut toxicitási teszt esetén a vizsgált oldattal illetve talajkivonattal nedvesített szűrőpapírra helyezik a tesztorganizmust, majd 24 és 48 óra elteltével megszámlálják az elpusztult egyedeket.

A mesterséges talaj teszt során nemzetközi szabványok szerint a tesztelendő minta szuszpenzióját a mesterséges talajba keverik, amelyre ráhelyezik a tesztorganizmusokat, majd 7 és 14 nap elteltével, megszámlálják az elpusztult gilisztákat.

4. Egyéb állati tesztszervezetek

Az eukariota egysejtűek közé tartozó **protozoák** a talaj pórusvizében élő élőlények, nagyon érzékeny tesztorganizmusok. Annak ellenére, hogy számos kutató és szakirodalom foglalkozik velük szabványosított módszer nem létezik. A protozoák közül a *Tetrahymena pyriformis*, a *Colpoda cullum* és a *Paramecium aurelium* használják ökotoxikológiai tesztorganizmusként.

A talaj pórusvizében élő protozoákon kívül a **nematodák** széles körben vizsgált tesztorganizmusok. Népszerűségüket annak köszönhetik, hogy a már korábban vizek vizsgálatára kifejlesztett és sokat tanulmányozott tesztekhez hasonló körülmények között végezhetőek. A **nematodák** közül a *Panagrellus redivivus* organizmust az Országos Közegészségügyi Intézetben használják szennyezett vizek és hulladékkivonatok tesztelésére.

A talajlakó **isopodák** a talajban lévő nehézfémeket felveszik és testükben akkumulálják, ezért a bioakkumulációs tesztek népszerű tesztorganizmusai. A használt isopodák a következők: *Porcellio scaber*, *Oniscus asellus*, *Trichoniscus pusillus*.

Számos **Collembola** fajt használnak talajvizsgálatra, így az *Onychiurus* fajokat, a *Folsomia candida*, a *Tullbergia granulata*, az *Orchesella cincta*. A fent említett tesztorganizmusok közül a *Folsomia*-teszt nemzetközileg szabványosított tesztmódszer (ISO/TC 190 SC4 WG2). (Gruiz, 2001)

2.1.3 Az eredmények megbízhatóságát befolyásoló tényezők

A biológiai tesztek alkalmazásakor egész sor olyan körülményt kell figyelembe venni, amelyek befolyásolják azok megbízhatóságát. Ha ezeket figyelmen kívül hagyjuk, olyan hibákat követünk el, amelyek miatt eredményeink a kívánt követelményeknek nem felelnek meg. Elsőként kell említeni a kísérleti állatok fiziológiai állapotát. Rendkívül fontos az, hogy a laboratóriumban tenyésztett teszt-szervezetek egészségesek legyenek. Az éhezõ, beteg, kénytelenül nem gondozott egyedekkel végzett vizsgálatok eredményei sem a rövid lejáratú, sem pedig a hosszantartó kísérletekben nem adnak reális képet a mérgező hatásról.

A toxikológiai tesztek értékelésénél további problémát jelent az is, hogy a teszt-élőlények minden csoportja többé és kevésbé érzékeny egyedekből áll. Ezért a teszt eredménye nemcsak a kísérleti körülményektől, hanem attól is függ, hogy vannak-e az élőlények között az átlagosnál érzékenyebb vagy ellenállóbb egyedek.

Ha a toxikus hatás kritériuma az élőlény pusztulása, akkor azt mondhatjuk, hogy minden egyednek saját halálos töménysége (LC_{50} értéke) van. Tapasztalati tény, hogy ezek az egyedi letális koncentrációk jelentősen különböznek egymástól, a legellenállóbb egyedeké néha 10-, sőt 100-szorosa a fokozottan érzékeny egyedekének. Az egyedi érzékenység azonban, valamely faj elég nagyszámú csoportján belül határozott törvény szerint oszlik meg. Ezt a törvényszerűséget az úgynevezett Beber-Fechner törvénnyel lehet magyarázni, ami szerint az anyag hatása a dózis logaritmusával arányos.

Következő csoportba a közeg megfelelő fiziko-kémiai tulajdonságainak a biztosítása tartozik. A hőmérséklet erősen befolyásolja az élőlények érzékenységét, ez különösen akkor fontos, amikor a határértékeket különböző módszerekkel számítjuk ki. Törekedni kell a természeteshez hasonló hőmérsékleten való munkára, ha erre nincs mód, laboratóriumi körülmények között általában 20-22 °C hőmérsékleten kell tesztelni.

Az ártalmatlan koncentráció értékének az akut módszerrel megállapított LC_{50} értékéből történő kiszámítása mindig nagy elővigyázatot igényel, mert könnyen nagy tévedéseket követhetünk el. Sok esetben nem kapunk reális eredményt, ezért lehetőség szerint párhuzamosan a krónikus vizsgálatot is kell végezni.

2.1.4 Az ökotoxikológiai vizsgálat végpontja

A környezetoxikológiai mérés végpontja a biokémiai szinttől az egyed és a közösség szintjén keresztül az ökoszisztéma szintjéig bárhol megválasztható a cél függvényében. A mérés végpontja a tesztorganizmuson vagy más szinten közvetlenül mért érték. A mért végpont eredménye alapján egyéb számításokkal tovább származtatva kapjuk a vizsgálat végpontját.

A tesztek eredményeinek kiértékelése

A tesztelés során valamely hatás pontosan ismert mennyiségére adott biológiai válasz mértékét határozzuk meg. A válaszok alapvetően két típusba sorolhatóak:

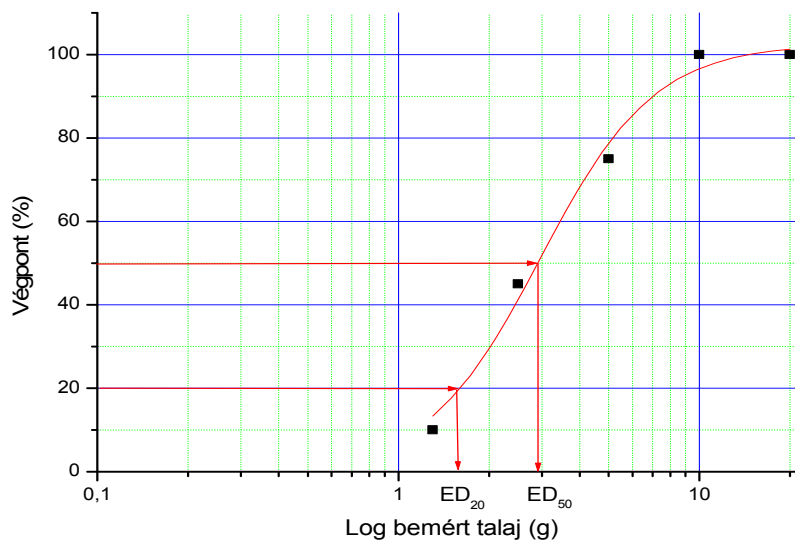
- a hatás-mennyiséggel arányos folytonos válasz (arányskálán mért folytonos változó), amilyenek pl. a fotoszintézis vagy a légzés intenzitásának változása a folyamatokat gátló anyag növekvő koncentrációjának függvényében,
- kvantált válasz. Ilyen pl. a teszt-élőlények pusztulása mérgező anyag hatására, amikor a kísérlet során, vagy az életben maradt vagy az elpusztult egyedek számát jegyezzük fel.

A válaszokat más szempontból is tipizálhatjuk: a válasz pozitív vagy negatív lehet aszerint, hogy:

- az életben maradt teszt-élőlények számát jegyezzük fel, amikor a kezeltlen kontroll v % értéke=100,
 - az elpusztult egyedek számát jegyezzük fel, amikor a kontroll v % értéke = 0
- (Fleit, 1989)

Grafikus meghatározás: az egyik esetben vizsgálhatjuk a környezetből az organizmusba bekerült szennyező, toxikus anyag mennyiségét, a dózist.

A **dózis-hatás** görbe az organizmusba bekerült növekvő mennyiségű környezeti minta toxikus anyagaiból adódó hatások változását mutatja (1. ábra), alakja szigmoid.



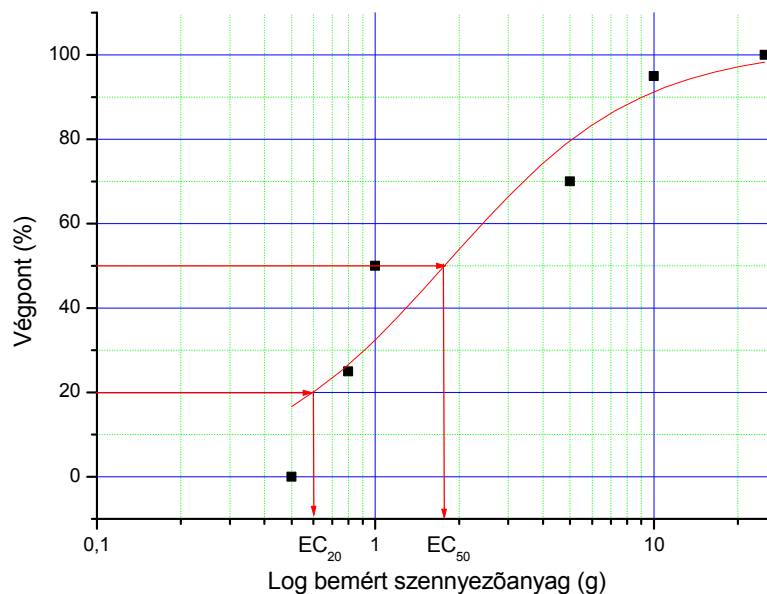
1. ábra Az ED₂₀ és ED₅₀ értékek grafikus meghatározása

A másik esetben, az ökotoxikológiai tesztek során, mivel az ökoszisztéma, illetve annak tagjai esetében nem tudunk közvetlenül a környezetből az organizmusba bekerült szennyező, toxikus anyag dózisértékét mérni, a környezetszennyező, toxikus anyag koncentrációját vizsgáljuk. Ennek az az oka, hogy a környezettel szoros kapcsolatban lévő organizmus a vegyi anyagnak több expozíciós útvonalon keresztül is ki van téve (például a növényi gyökerek lokálisan kibocsátott anyagaikkal mobilizálják a környezetükben lévő anyagokat); emiatt a környezeti koncentráció és a felvett szennyező, toxikus anyag dózisa nincs egymással szoros összefüggésben.

A környezeti koncentráció – felvett dózis arányt nagyban befolyásolja az organizmus faji jellege, alakja, fajlagos felülete, határolófelületének minősége, légzése.

A **koncentráció-hatás** összefüggést úgy vizsgáljuk, hogy a vizsgált vegyi anyag vagy környezeti minta növekvő koncentrációinak függvényében mérjük a hatást (a megfelelően megválasztott ökotoxikológiai végpontot.)

A koncentráció-hatás görbe (2. ábra) szigmoid alakú, megmutatja a növekvő vegyi anyag koncentráció függvényében mért kumulált (összegzett) toxicitást.(Gruiz, 2001)



2. ábra Az EC₂₀ és EC₅₀ értékek grafikus meghatározása

2.2 A talaj

2.2.1 A talaj jellemzői

A talaj a szilárd földkéreg legfelső rétege. Talajnak tekinthető mindaz, ami a felszín és a talajképző kőzet közt helyezkedik el. A talaj a földi anyag- és energiaátalakulásnak egyik fontos közege. Itt kapcsolódnak össze a biológiai, a geológiai és a hidrológiai körfolyamatok.

2.2.2 A talaj szerepe

A talaj egyik fő funkciója, hogy szerepet játszik az elemek körforgásában. A talajt alkotó szervesanyagok a mállott kőzet elemforrásként szerepelhetnek. A holt szerves anyagok ásványosításakor (mineralizáció) a biológiailag kötött elemek elemi formában, vagy egyszerű szervesanyagok formájában szabadulnak fel és így újra bekerülnek a körfolyamatba.

A talaj másik funkciója, hogy a növények számára tápanyagforrásként szolgál. Ezenkívül a szárazföldi növények termőhelye. Termékenységét azt fejezi ki, hogy mennyire képes a növényeket megfelelő időben szükséges mennyiségű és összetételű tápanyaggal és vízzel ellátni.

Az elemek körforgásában és az élőhelyként játszott szerep mellett jelentős a felszínről beszivárgó és a mélyebb rétegekbe továbbjutó folyadékok összetételének meghatározásában, a felszíni szennyeződések mélyebb rétegekbe kerülésének megakadályozásában betöltött szerepe. A talaj szűrő funkciója a szennyezőanyagok fizikai, kémiai és biológiai úton történő megkötését, bontását, valamint visszatartását egyaránt jelenti.

2.2.3 A talaj keletkezése és pusztulása

A kőzetek a földfelszínen különböző átalakuláson mennek keresztül. A talajképződési folyamatokat a kőzetek fizikai és kémiai mállása előzi meg.

- *fizikai mállás*: A kőzet szemcséit a hőmérséklet ingadozása, a víz és a szél koptató hatása, valamint a növényzet gyökerei folyamatosan aprítják. Ez az aprózódás azonban csak kb. 0,01 mm átmérőjű szemcseméretig megy végbe, ugyanis ennél kisebb szemcsék csak kémiai mállással képződhetnek.

- *kémiai mállás*: A kőzet anyagában lejátszódó kémiai és ásványtani változásokat jelenti, mint például oldódás-kicsapódás, oxidáció-redukció, szilikátok hidrolízise, savas oldatok hatása, stb. Ezek a változások azért mennek végbe, mert a felszínre került és aprózódásnak indult kőzet az eredeti környezetéből egy teljesen új környezetbe került. Az ásványok minőségét meghatározó paraméterek (pl. hőmérséklet, nyomás) megváltozásával eltolódnak a már kialakult egyensúlyok, s ez az ásványok minőségének változásával jár együtt.

- *biológiai mállás*: A talajban élő mikroorganizmusok, növények és állatok az élettevékenységük révén folyamatosan változtatják a talaj kémhatását és redox-viszonyait, szemcsézettségét és a szerves anyag tartalmát, élet folyamataikhoz pedig ásványi anyagokat vonnak ki a kőzetekből. A biológiai mállás tehát nem más, mint a talajlakó élőlények tevékenysége során végbemenő, talajképződéshez vezető fizikai és kémiai mállás.

A talajképződés mellett meg kell említenünk a talaj pusztulását is. A folyamat végbemehet kémiai degradáció (talaj ásványi anyag vagy szerves anyag mennyiségének jelentős csökkenése), fizikai degradáció (talajszemcsék szétesése), szél- vagy vízerózió következményeként. Ez utóbbi két folyamat a talaj növénytakaróját is jelentősen csökkentheti. A növényzet szerepe a talajszemcsék rögzítése, megkötése, a nedvesség felszívása, valamint a csapadék mennyiségének csökkentése a levelek vízfelfogása révén.

2.2.4 A talaj felépítése

A talajt élő (biotikus) szervezetek és élettelen (abiotikus) anyagok alkotják. Utóbbiak lehetnek holt szerves, vagy szervetlen vegyületek. Az abiotikus talajkomponensek a talajszelvény felső részén háromfázisú polidiszperz rendszert (szilárd talajszemcse, talajvíz, talajlevegő) alkotnak. E három fázis összetétele és egymáshoz viszonyított aránya határoz meg minden folyamatot a talajban.

2.2.4.1 Gázfázis

A talajlevegő a talaj pórusaiban helyezkedik el, a pórusok talajnedvesség által el nem foglalt részét tölti ki. Fő alkotói a vízgőz, szén-dioxid, oxigén, nitrogén, ammónia, kénhidrogén és a talaj szerves anyagainak bomlásakor felszabaduló egyéb gázok (pl. metán).

A talajpórusokban lejátszódó biológiai folyamatok szabályozzák az oxigén és a szén-dioxid mennyiségét. Az oxigén kizárólag a légkörből kerül be a talajba, ahol az élőlények légzésére és a redox folyamatokra van nagy hatással. A szén-dioxid a gyökérlégzésnek és a talajlakó élőlényeknek tevékenységének tulajdonítható és a pH-ra van nagy hatással. A talajlevegő oxigén tartalma kisebb, míg a szén-dioxid tartalom nagyobb, mint a légköri levegőé. A talajban végbemenő biokémiai folyamatok a talajlevegő oxigén tartalmától függően oxidatív vagy redukzív irányba tolódhatnak el.

2.2.4.2 Folyadékfázis

A talajnedvesség közvetlen kapcsolatban áll a talaj szilárd és légnemű fázisával, valamint a növényzet gyökérrendszerével. A szemcsék közti kisebb pórusok tárolják, míg a nagyobbak vezetik a vizet.

A talajnedvesség különböző formáiról beszélhetünk.

- a kötött víz nem oldja az ásványi sókat és tápanyagokat. A kémiaileg kötött szerkezeti víz a talajásványok alkotórésze. Fizikailag kötött, adszorbeált víz a kolloidok felületén, talajpórusok falán helyezkedik el. A biológiailag kötött víz, pedig a szemcsék felületén kialakult biofilmet alkotja.
- a szabad víz, mint a talajvíz és a vízgőz a kapillárisok telítődése után jelenik meg, nem, vagy csak gyengén kötődik a szilárd fázishoz.

A mikroorganizmusok és növények szempontjából a számukra hasznosítható, illetve a nem hasznosítható holt vizet különböztethetjük meg.

Kémiai összetétele

- ásványi sók: Oldott állapotban, ionokra disszociált formában vannak jelen.
(Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Al^{3+} ,
 HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-)
- szerves anyagok: Oldott formában jelen levő
- oldott gázok: A legjelentősebb a szén-dioxid és az oxigén.

A talajnedvesség mindig tartalmaz oldott sókat. A sók oldhatósága a kémiai összetételüktől, mennyiségüktől, az egyéb jelenlévő anyagoktól, a talajnedvesség kémhatásától és a redoxviszonyoktól egyaránt függ.

A talaj kémhatását tulajdonképpen a szervetlen és szerves összetevők savas és bázikus jellege határozza meg. A talaj pH-ját tehát a talaj folyékony fázisának kémhatása adja. Mivel azonban ennek mennyisége a talaj éppen aktuális nedvesség tartalmától függ, így szabvány szerint a pH-mérésnek légszáraz talajból kell történnie. A szuszpenzió kémhatása alapján a talaj kémhatása savanyú, semleges vagy lúgos lehet.

A talaj redoxviszonyait a levegőellátottság, vagyis közvetetten a talaj nedvesség tartalma, kémhatása, szemcsézettsége, a szemcsék mérete stb. határozza meg.

A talaj pH-ja és redoxpotenciálja nem független egymástól, mivel sok redox reakció függ a H^+ koncentrációtól. A talajban lehetséges alsó és felső redoxpotenciál értékeit a talaj pH-ja mellett az oxigén- és a hidrogéngáz parciális nyomása határozza meg.

2.2.4.3 Szilárd fázis

A talaj szilárd fázisát különböző szemcsenagyságú részek alkotják:

- homokfrakció: főleg kvarc és szilikátok alkotják, míg a Fe- és Al-oxidok csak a talajszemcsék bevonataként vannak jelen.
- iszapfrakció: A homokkal összehasonlítva a kvarc és a szilikát mennyisége kevesebb, míg az oxidoké több.
- agyag és humuszfrakció: Kvarc tartalma még kevesebb, az agyagásványok és a mállási termékek aránya pedig jelentősen megnő. Az agyag szerves, a humusz szerves kolloidok keveréke, melyek a talajszemcséket rögökké, aggregátumokká ragasztják össze, megkötik a tápanyagokat.

1. táblázat A talaj szilárd fázisát alkotó szemcsék mérete

Talajszemcsék	Talajszemcsék mérete
Közzettörmelék	>7 mm
Kavics	2-7 mm
Homok	0,02-2 mm
Iszap	0,002-0,02 mm
Agyag, humusz	<0,002 mm

Az aggregátumokat méretük szerint csoportosíthatjuk.

- mikroaggregátum <0,25 mm , por frakció
- makroaggregátum 0,25-10 mm , morzsa frakció
- megaaggregátum >20 mm , rög frakció

Az aggregátumok képződését az anyagok belsejében érvényesülő kohéziós és felületeken ható adhéziós erők biztosítják. Az aggregátumok összetapadását kötőanyagok segítik, mint például szerves bomlástermékek, humuszanyagok, agyagásványok, talajlakó élőlények által termelt nyálkaanyagok. Mivel a rögök nem töltik ki teljesen a rendelkezésre álló teret, az így képződő pórusokban víz és levegő található. (Stefanovits, 1999)

A talaj ásványi alkotórészei

A talajalkotó ásványok közül meg kell említeni a kloridokat, szulfátokat, szulfidokat, nitrátokat, foszfátokat, borátokat, karbonátokat, oxidokat és az oxidhidrátokat.

A szilikátokra, agyagásványokra jellemző, hogy a Si atom körül négy O atom tetraédes elrendeződésben helyezkedik el. A tetraéder középpontjában K-, Na-, Ca-, Mg-, Al-, Fe-, Ti-kationok épülhetnek be.

A talaj szerves anyagai

- a talajban lévő élőlények és a növények gyökérzete
- az elhalt növényi és állati maradványok
- a maradványok bomlásával felszabaduló vegyületek
- ezek utólagos összekapcsolódásával létrejövő, kolloid mérettartományba eső szerves vegyületek, a humuszanyagok

A talajban leggyakrabban előforduló szerves anyagok közé tartoznak az egyszerű szénhidrátok, cellulóz, hemicellulóz, keményítő, lignin, zsírok, viaszok, gyanták, fehérjék. A könnyen bontható szerves anyagokból hidrolízissel, oxidációval, mikroorganizmusok enzimes bontásával mikro tápanyagok szabadulnak fel. Az ásványi formákká alakulás folyamata a mineralizáció.

Humifikáció során a nehezen bontható szerves vegyületek polimerizálódnak, N-tartalmú anyagokkal kapcsolódnak össze, s végül nagy molekulájú humuszanyagokká alakulnak.

A humusznak több szempontból is fontos szerepe van a talajban. Felelős a talajszerkezet kialakításában, a tápanyag biztosításában és megőrzésében. Ezenkívül sav/bázis pufferoló hatása által megvédi a talajt a gyors pH-változásoktól. Mérsékelik a különféle környezeti ártalmakat, mivel megköti a szerves szennyezőanyagokat és a toxikus fémeket, csökkentve ezzel azok hozzáférhetőségét és toxikus hatását.

2.2.4.4 A talaj élőlényei

A talaj élővilága igen összetett. A táplálkozási szinteken, az úgynevezett trofikus szinteken, pontosabban a termelőkön (növények), elsődleges és másodlagos fogyasztókon és a ragadozókon kívül az egyik legnagyobb szerepe a detritusznak, a talajban élő, a holt szervesanyag feldolgozását végző élőlényközösségnek van. A humuszképzés és a mineralizáció is ezeknek az élőlényeknek köszönhető. A mineralizáció teszi lehetővé a holt szervesanyag körforgásba való visszajutását. A mineralizáció a mikroorganizmusok energiatermelésének eredménye, mivel azok képesek felhasználni és lebontani a holt anyagot.

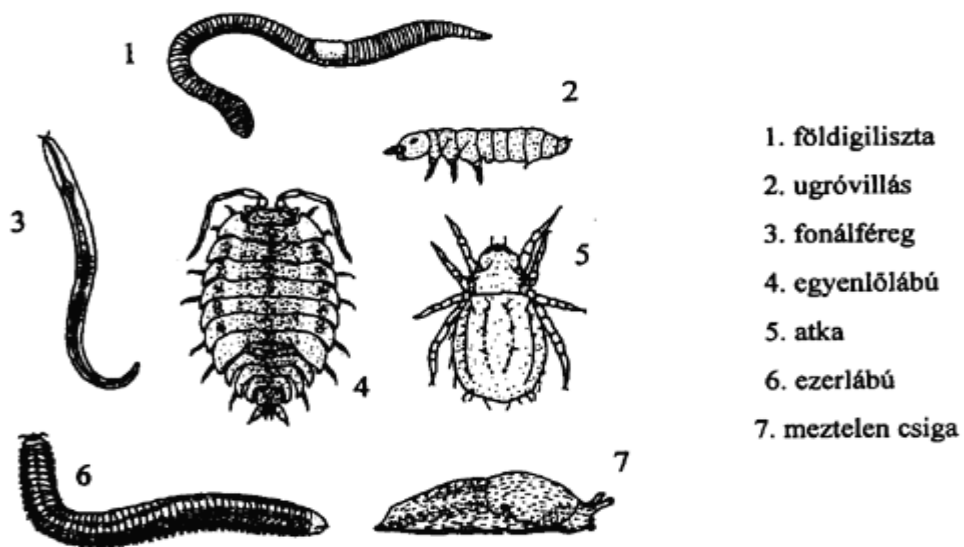
A detritusz, és némely esetben a növényzet is, tápanyagként viszonyulhat a szennyező anyagokhoz. Ha rendelkezik a megfelelő enzimrendszerrel, amely képes szubsztrátként megkötni az adott vegyületeket, akkor lebontják és felhasználják. A nagyfokú genetikai potenciál, amellyel a detritusz rendelkezik, képessé teszi a legáltalánosabb felépítésű szennyezőanyagok lebontására is.

A talaj mikroorganizmusok élettere a szemcsék felülete és a kapillárisai (3. ábra). A talaj egy grammja több millió vagy akár több milliárd sejtet is tartalmazhat. A vízfázisban, érdekes módon, elenyészően kevés baktérium, protozoa és gomba él.



3. ábra Mikroorganizmusok élettere a talajban

Legnagyobb mennyiségben az *Arthrobacter*, a *Pseudomonas*, a *Bacillus*, az *Azotobacter* nemzetség tagjai és a nitrogénkörforgásért felelős *Nitrosomonas* és *Nitrobacter* baktérium fajok találhatóak a talajban. Az *Actinomyceták* közül a *Streptomyces*, a gombák közül az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* és a *Cladosporium* fajok találhatóak nagy számban. A protozoák, mészhéjúak és csillósok közül a *Tetrahymena* és a *Colpoda* fajok említése fontos ökotoxikológiai jelentőségük miatt. Többsejtű állatok is vannak (4. ábra), melyek közül többet is alkalmaznak ökotoxikológiai tesztekben.



4. ábra Többsejtű talajlakó állatok

A talajt mikrobiológiai szempontból három típusra oszthatjuk.

- "A" típusú talajok: aktív mikroorganizmusok vegetatív állapotban, táplálkozási közösségben élnek, nagymértékben folyik a mineralizáció, a szaporodás és a sejtanyag-termelés. A pusztulást lekörözi a megújulás.
- "D" típusú talajok: ezekben a pusztulás dominál, a pusztulás mindig megelőzi a megújulást (tápanyaghiány, toxikus anyag jelenléte, kiszáradás, oxigénhiány).
- "I" típusú talajok: abiotikus folyamatok és átalakulások a jellemzőek, a mikrobák inaktívan, spórákként, nyugvó sejtekként vannak jelen.

Ez a három típusú talaj, mint tömör mozaik alkotják a talaj egészét (Szabó, 1996)

3. Anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben ismertetem a munkám során használt és általam módosított ökotoxikológiai vizsgálatokat, valamint a felhasznált mérőrendszert és a mérőrendszerrel követett kísérletek összeállítását.

3.1 *Collembola* teszt

A *Folsomia candida* az ugróvillások (Collembolák) rendjébe tartozó, ősi rovar. Apró (max. 3–4 mm hosszú) fehér állatkák, a hasi oldalukon ugróvillájuk van, amit ha hátra csapnak felpattannak a levegőbe. A talajban élnek, erdőben előfordulhat, hogy m²-enként 100 000 található belőlük. Hasi tömlővel lélegzik, emiatt a talajgőzökre érzékenyen reagál. A *Collembolák* természetes környezetükben szerves törmelékkal, gomba fonalakkal táplálkoznak, (1. kép) ami labor körülmények között a gipszlap felszínére szórt szárított sütőélesztővel helyettesíthető.



1. kép *Collembolák* táplálkozása

A vizsgálathoz azonos korú (14 napos) állatkákból álló szinkrontenyészetet kell felhasználni, ezért szükséges a szinkron populáció létrehozása. Ehhez egy a fenti módon elkészített, megnedvesített gipszlapra 50 db állatot helyeztem, amelyek 2-3 napon belül lepetéztek. A peték kb. 2 hét (10-12 nap) múlva keltek ki (ilyenkor egész apró állatkák is megfigyelhetőek voltak, melyektől el kellett távolítani az idősebb egyedeket a lapról). Az állatok sérülésmentes áthelyezéséhez egy speciális, saját fejlesztésű edénykét használtam.

A faj akut és krónikus teszthez is használható, én akut teszteket végeztem, melyek 7 napig tartottak, és azt figyeltem, hogy hány százalékban maradt meg az állatok a vizsgált mintán. Ezzel a teszttel a minta hígításából az EC₂₀-at és EC₅₀-et vagy ED₂₀-at és ED₅₀-et határoztam meg.

3.1.1 Akut vizsgálat kivitelezése

A teszthez 20-20 g légszáras vizsgálandó talajmintát mértem be 370 ml-es befőttes üvegekbe, majd a mintákat 5-5 ml vízzel megnedvesítettem és 2-2 mg élesztőt szórtam a tetejükre. Az üvegekbe 10-10 db állatkát tettem át a fent említett átrakóval. A teszt edényeket 7 napig sötétben, 20-25°C-os helyen tartottam, majd kiértékeltem.

ED₂₀ és ED₅₀ meghatározása céljából, a mintákból hígítási sort készítettem. A hígításhoz valamint kontrollként OECD standard talajt használtam.

2. táblázat Az OECD talaj összetétele

Összetevő	Mennyiség, %
Tőzeg	10
Kaolinit agyag (min. 30% kaolinit tartalom)	20
Ipari kvarc homok	70

3. táblázat A mintáknál alkalmazott hígítási sor

Minta, g	20	10	5	2,5	1,25
OECD, g	0	10	15	17,5	18,75

3.1.2 Az akut vizsgálat kiértékelése

A teszt edényekben levő talajt vízzel felfuszpendáltam.

Az edényben a talajt óvatosan megkevertem, hogy az egyben maradt rögök szétessenek, és az állatkák feljuthassanak a víz felszínre. A felszínen úszkáló állatkákat megszámláltam.

A megmaradt illetve elpusztult állatkák számából következtettem a vizsgált minta toxicitására. A kontroll talajhoz (OECD) viszonyítva megadtam a vizsgált mintákban a pusztulást %-ban kifejezve.

A hígítási sorból kapott értékeket (kontrollhoz viszonyított gátlási százalék - pusztulás) a bemért talajmennyiségek függvényében ábrázoltam.

A kapott pontokra görbét illesztettem, aminek alapján meghatározhatóvá vált a 20 és az 50%-os pusztuláshoz tartozó talajmennyiség (ED₂₀ és ED₅₀). (Gruiz, 2001)

A talajminták toxicitásának jellemzése a 4. táblázat alapján történt.

4. táblázat A talajminták toxicitásának jellemzése a *Folsomia candida* mortalitási teszt eredménye alapján

ED ₂₀ [g]	ED ₅₀ [g]	Jellemzés
> 20	> 20	Nem toxikus
12-20	16-20	Enyhén toxikus
2-12	4-16	Toxikus
< 2	< 4	Nagyon toxikus

3.2 *Tetrahymena pyriformis* reprodukciógátlás teszt

A *Tetrahymena pyriformis* (továbbiakban *Tetrahymena*) 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.



2. kép 6 napos *Tetrahymena pyriformis* tenyészet

3.2.1 A teszt ismertetése

0,25 g légszáraz, porított talajt bemértem 8-8 db kémcsőbe, majd steriliztem 10 percig 120 °C-n. Steril körülmények között 5 ml steril tápoldatot adtam minden egyes mintához, továbbá 26 l Penicillin- (0,2 %-os), Streptomycin- (2%-os) és Nystatin oldatot (1%-os). Összerázás után 100µl 6 napos *Tetrahymena pyriformis* tenyészetet oltottam be az egyes csövekbe.

Összerázás után inkubáltam 72 órán át 400 rpm fordulatszámon rázatva, sötétben, 20 °C-s termosztátban. Ahhoz, hogy az egysejtű szaporodási görbéje megrajzolhatóvá váljon, 72 h alatt négy alkalommal vettem mintát. Az általam alkalmazott mintavételi időbeosztás: 0h; 20-24h; 40-48h; 64-72h. Mikroszkóp segítségével 10 x nagyítás alatt meghatároztam az aktuális sejtszámot. (LOKKOCK A, 2005)

3.2.1.2 A mikroszkópos sejtszám-meghatározás menete

Összerázás után 1 ml oldathoz 100µl 0,5 %-os formalint adtam, majd újabb homogenizálás után 2 µl-t Bürker kamrára tettem, s mikroszkóp alatt megszámloltam a folyadékcseppben található összes sejtet. Több párhuzamos vizsgálatot végeztem és az idő függvényében ábrázoltam a kapott sejtszámok átlagát.

3.2.1.3 Tetrahymena pyriformis tenyészet fenntartása

5 ml, steril PP mediumban (1 g tripton és 0,1 g élesztőkivonat feloldva 100 ml csapvízzel) tartottam fenn az egysejtű tenyészetet. Steril körülmények között 100µl 6 napos Tetrahymena pyriformis tenyészetet oltottam be az 5 ml steril tápoldatba. A tenyészetet ezután 20 °C termosztátban, sötétben tároltam.

3.2.1.4 Tetrahymena teszt talajkivonatok vizsgálatára

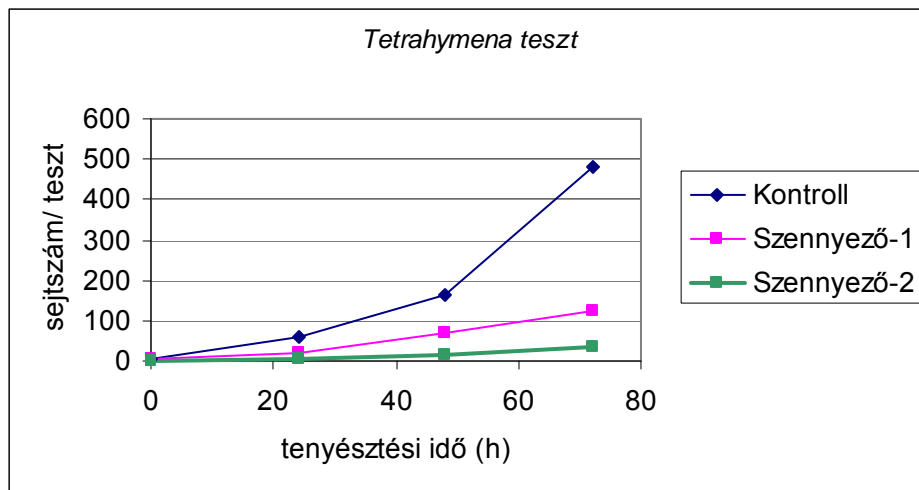
Az alap teszthez hasonlóan jártam el, azzal a kivétellel, hogy 0,25 g légszáraz, porított talaj helyett a megfelelő talajminta desztillált vizes kivonatából mértem be 2-2 kémcsőbe 1 ml-t.

Talajkivonat készítése

50 g légszáraz, a vizsgálandó koncentrációnak megfelelően szennyezett talajt mértem be 0,1 g pontossággal és 500 ml desztillált vízzel felöntöttem. Az így kapott szuszpenziót erőteljesen összeráztam, majd szobahőmérsékleten, 20 percig ultrahangos rázatógépen rázattam. A rázatás befejezése után a szuszpenziót 24 h ülepítettem. A mintát előszűrtem szűrőpapíron, majd a vizsgálatok megkezdéséig hűtőszekrényben tároltam.

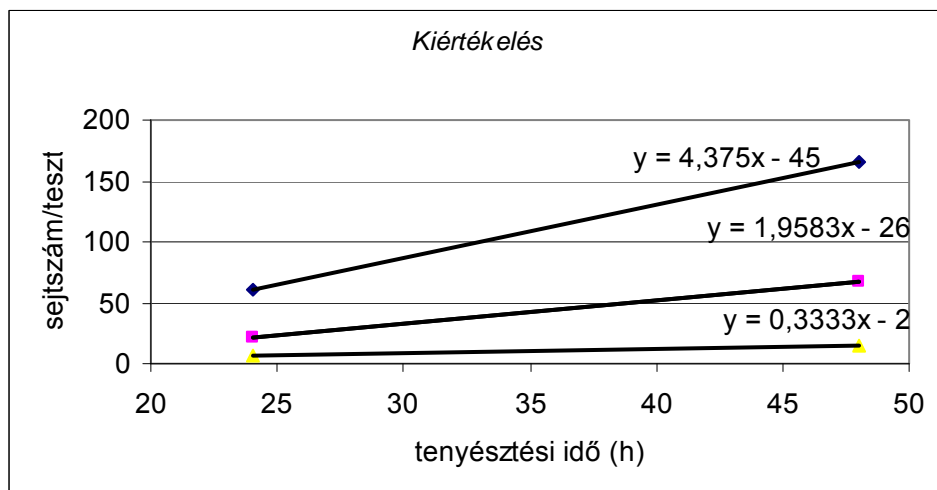
3.2.2 A teszt kiértékelése

A mikroszkópos sejtszámlálás eredményeit a 5. ábrának megfelelően ábrázolhatjuk az idő függvényében.



5. ábra A *Tetrahymena* teszt eredményeinek ábrázolása az idő függvényében

A szaporodási görbe exponenciális szakaszában a szaporodási sebesség maximális és állandó. Ez a fajlagos szaporodási tényező, mely az exponenciális szakaszra illesztett egyenes meredeksége, jellemző az adott összetételű tápoldatban szaporodó egysejtű tenyésztetre. A fajlagos szaporodási tényező annál kisebb, minél toxikusabb a szennyezett talajt tartalmazó tápoldat. Így tehát közvetlenül kapunk információt a szennyezett talajok toxikus hatásáról az egysejtű szaporodására nézve.



6. ábra A *Tetrahymena* teszt eredményeinek kiértékelése az egyenesek meredeksége alapján

A szaporodás gátlás százalékos értékét a méréskor kapott görbékre illesztett egyenesek meredekségeiből (6. ábra) számolható ki az egyenlet segítségével.

1. egyenlet A szaporodás gátlás %-os értékének meghatározása

$$\text{szaporodás gátlás [\%]} = \frac{a_k - a_{sz1}}{a_{sz2}} * 100$$

Ahol,

a_k = a kontroll meredeksége

a_{sz1} = a szennyező anyag első koncentrációja

a_{sz2} = a szennyező anyag második koncentrációja

3.2.3 Módszerfejlesztés

A teszt összehasonlítható kiértékeléséhez a módszer eredményeit megpróbáltam átvezetni az általam (a többi teszténél is) használt koncentráció-hatás görbére. Ennek érdekében a teszt 24-és 52 óra közötti szakaszát ábrázoltam és az erre szerkesztett egyenesek meredekségeiből számoltam a szaporodás gátlás %-os értékeit minden egyes mintára (koncentrációra) a 2. egyenletnek megfelelően. Kontrollnak a szennyezetlen talajt vettem.

2. egyenlet A szaporodás gátlás %-os értékének meghatározása esetében

$$\text{szaporodás gátlás [\%]} = \frac{a_{kontroll} - a_{min\ ta}}{a_{kontroll}} * 100$$

Microcal Origin 6.0 program segítségével ábrázoltam a szaporodás gátlás %-os értékeit a szennyezett talaj koncentrációjának függvényében, majd leolvastam EC_{20} és EC_{50} értékeit.

3.3 Daphnia-teszt

Daphniának nevezzük azon állatokat, melyek a köznyelvben vízibolhaként terjedtek el. Ezek túlnyomórészt apró, héjas állatok, melyek az ágascsapú rákok (*Cladocera*) rendjébe tartoznak és rokonságban állnak a bolharákokkal (*Gammarus* fajok) és a sórákokkal (*Artemia* faj). A köznyelvben elterjedt nevét (bolha) a vízben történő, ugrásszerű mozgásáról kapta. Fajai közül a *Daphnia magna* (3. kép) általában a legérzékenyebb szennyezésekkel szemben és ezen oknál fogva kísérleteimhez is ezt a fajt használtam, melyet a továbbiakban csak *Daphnia*-ként fogok említeni.



3. kép *Daphnia magna*

A *Daphnia*-teszt az akut víztoxikológiai eljárások leggyakrabban használt módszere. Oka, hogy mégis alkalmazom talajok vizsgálatára, az, hogy kíváncsi voltam az általam alkalmazott szennyező anyagok kimosódás általi kockázatára a vízi élőhelyeket tekintve, továbbá szerettem volna a kapott eredményeket összehasonlítani az eddig leírt ökotoxikológiai tesztek eredményeivel. (Gruiz, 2001)

3.3.1 Általános teszt kivitelezése

A vizsgálandó mintából, állott és levegőztetett csapvízzel, két párhuzamos hígítási sorozatot készítünk, az 5. táblázat szerinti elosztásban.

5. táblázat Hígítási sorozat készítése

hígítás	töménység
1x (eredeti)	100
2x	50
10x	10
50x	2
100x	1
500x	0,2

A hígítási sorozat minden tagjából 100-100 ml-t főzőpoharakba töltünk és minden edénybe 10-10 db negyedik fejlődési stádiumban lévő egészséges *Daphnia* példányt helyezünk.

A kísérlet alatt a teszt-állatok táplálékot nem kapnak. Az edényeket szobahőmérsékleten, természetes szórt fényben tartjuk, levegőztetés nélkül.

A kísérlet időtartama 48 óra. Az azonnal, továbbá az 1, 6, 24, 48 óra múlva mozgásképtelenné vált egyedek számát feljegyezzük. Ha hígítóvízzel készült kontrollban is találunk elpusztult egyedeket, akkor a kísérlet nem értékelhető.

A tenyészetek érzékenysége időben változhat, ezért azt két havonta ellenőrizni kell, kálium-dikromát hígítási sorozattal, amelyek tagjainak $K_2Cr_2O_7$ koncentrációja: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 és 2,00 mg/l.

Ha az ellenőrző vizsgálat szerint a közepes tűrési határ értéke a 0,0 és 1,5 mg/l koncentrációhatárok közé esik, a tenyészet tesztelésre alkalmas, egyébként új tenyészetet kell előállítani más *Daphnia*-törzssel. (Fleit, 1989)

3.3.2 Módszerfejlesztés

Az eredeti tesz módosítására több okból is szükség volt. Az első ok, hogy a teszt eredetileg nem talaj-mintákra lett kifejlesztve, így szükségessé vált annak adaptálása erre a közegre. A másik problémát az jelentette, hogy a vizsgálandó anyagok közül a fenantrén nem vízoldható.

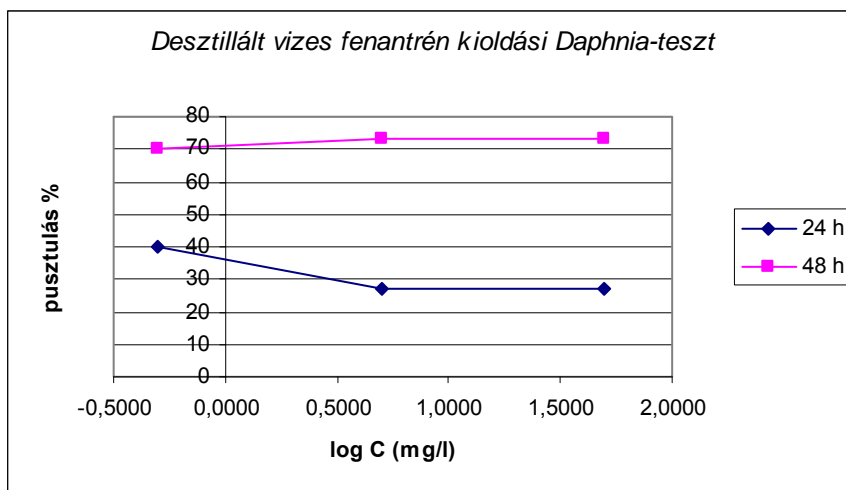
2.3.2.1 Teszt adaptálása talajra

A vizsgálandó mintákat előre meghatározott koncentrációkban szennyeztem labor körülmények között fenantrénnel, majd ezekből desztillált vizes talajkivonatokat készítettem a *Tetrahymena* tesztnél már ismertetett módon.

A kész kivonatokból 100–100 ml-t töltöttem ki főzőpoharakba, majd 30 percnyi üleptés után 3 párhuzamos mérést indítva minden edénybe 10-10 db állatot raktam át a laborban erre a célra kifejlesztett speciális hálók segítségével. 24 illetve 48 óra múlva feljegyeztem az elpusztult és mozgás képtelenné vált egyedek számát. (6. táblázat)

6. táblázat *Daphnia* adaptálási kísérlet eredményei fenantrénnel szennyezett talajból készült desztillált vizes kivonat esetén

Koncentráció	pusztulás db		mért értékek		
	24 h	48 h	oldott oxigén (mg/l)	pH	vezető képesség (mikro S)
kontroll	1	2	5,05	6,87	585
5 ppm fenantrén	12	21	5,65	6,75	528
50 ppm fenantrén	8	22	5,73	7,15	539
500 ppm fenantrén	8	22	5,79	7,18	576



7. ábra *Daphnia magna* tesztorganizmussal végzett desztillált vizes, fenantrén kioldási teszt

A próba sorozatban kapott eredményekből látható, hogy az 50%-hoz tartozó értéket ezekkel a koncentrációkkal nem értem el, illetve szükséges még további hígítások készítése a mérés pontosabbá tételéhez, valamint érdemes lenne a fenantrént oldatba vinni, hiszen a pusztulások nem feltétlenül tulajdoníthatóak ennek az anyagnak.

3.3.2.2 Kioldási teszt

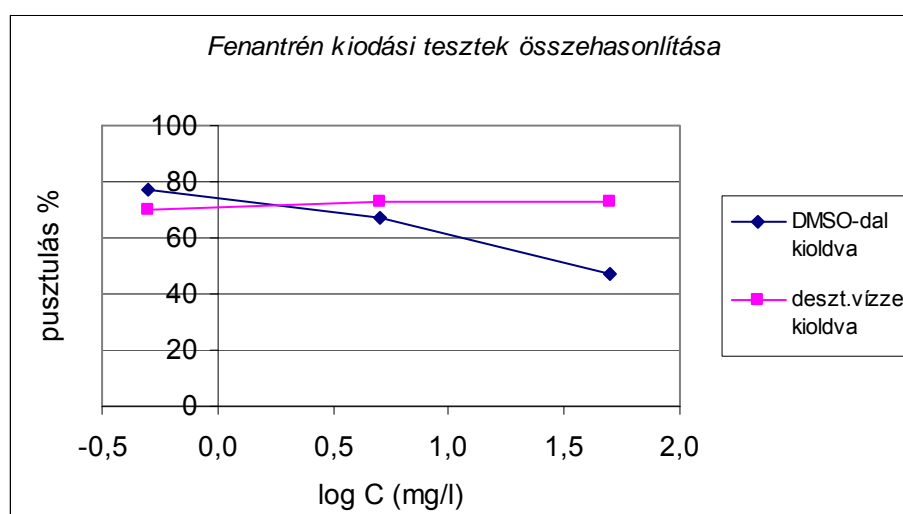
A fenantrénnel szennyezett, vizes talajkivonat mellett párhuzamosan indítottam egy olyan mérési sorozatot, melyben a fenantrén kioldását dimetil-szulfoxid (DMSO) oldattal próbáltam elősegíteni.

A teszt indítása előtt 24 órás megfigyelésnek vettem alá 3 párhuzamosan indított edényben a daphniák viselkedését, hiszen az irodalomban nem találtam utalást erre az anyagra vonatkozó érzékenységre. A tesztelés során jelentős pusztulást nem tapasztaltam.

Talajkivonat készítésénél desztillált víz helyett 500 ml 1 g/dm³ koncentrációjú dimetil-szulfoxid oldatot használtam, majd az előzőekben már említett módon haladtam tovább a kísérlettel. *Daphnia* adaptálási kísérlet eredményei fenantrén szennyező anyag esetén.

7. táblázat *Daphnia* adaptálási kísérlet eredményei fenantrénnel szennyezett talajból készült DMSO-os kivonat esetén kioldási

Koncentráció	pusztulás db		mért értékek		
	24 h	48 h	oldott oxigén (mg/l)	pH	vezetőképesség (mikro S)
kontroll	4	7	6,15	7,10	640
5 ppm fenantrén	16	23	5,38	7,14	659
50 ppm fenantrén	8	20	5,75	7,19	576
500 ppm fenantrén	7	14	5,58	7,21	568



8. ábra 48 órás toxikológiai eredmények összehasonlítása DMSO és desztillált víz alkalmazása esetén

Az eredmények azt mutatják, hogy a fenantrént sikerült egy bizonyos mértékig kioldani, de ha a kontroll értékeit is figyelembe vesszük ezek az eredmények nem megbízhatóak és nem a reális pusztulás %-ot mutatják. Így a további vizsgálataimat desztillált vizes kivonatokkal végzem.

3.4 A kísérletek során felhasznált anyagok

3.4.1 Vizsgált talajok

A Sensomat rendszer elővizsgálatainál 3 féle talajt használtunk – kerti talajt, fekete talaj, agyagos talaj – melyek Heves községéből származnak. Az ökotoxikológiai teszteknel csak a fekete talajt vizsgáltuk.

A minta talajok analitikai összetétele a 8. és 9. táblázatban található.

8. táblázat A vizsgált minták szervesetlen anyag tartalma

koncentráció (mg/kg)	Minta azonosító		
	kerti talaj	fekete talaj	agyagos talaj
Al	5310	6840	11300
As	3,94	2,91	10,6
B	46,7	9,77	15,2
Ca	19000	5090	27100
Cd	0,226	0,189	0,286
Co	3,3	4,73	6,79
Cr	7,58	10,7	17,3
Cu	30,5	67	23,6
Fe	8830	11500	18200
Hg	< 0,06	< 0,06	0,082
K	2860	2160	5000
Mg	4960	2670	7520
Mn	187	294	496
Mo	0,456	0,109	0,29
Na	235	93,8	489
Ni	7,83	10,4	16,6
P	1010	1020	2240
Pb	10,4	13,5	16,9
S	851	248	564
Se	0,689	0,5	1,07
Zn	78,9	81,4	91,9

9. táblázat A vizsgált minták tápanyag tartalma

koncentráció (mg/kg)	Minta azonosító		
	kerti talaj	fekete talaj	agyagos talaj
Ca (mg/kg)	14300	4320	20100
K ₂ O (mg/kg)	2210	348	2880
NH ₄ -N (mg/kg)	4,29	2,06	3,32
NO ₂ +NO ₃ -N (mg/kg)	113	6,93	62,1
P ₂ O ₅ (mg/kg)	832	1190	3050

3.4.2 A tesztekhez felhasznált adalékok, tápoldatok

A légzésmérő rendszernél a szén-dioxid elnyeléséhez granulált nátrium-hidroxidot használtam.

Az adalékok összetétele:

Húslé: 5g pepton

5g glükóz

3g húskivonat

0.5g nátrium-klorid

1000cm³ víz

Tápsó: 0,6 g KH₂PO₄

0,1 g (NH₄)₂SO₄

0,14 g Na₂SO₄

0,5 g NaCl

0,13 g MgCl₂ x 6H₂O

0,001 g CaCl₂ x 2H₂O

0,5 g KNO₃

1 cm³ Nyomelem oldat

1000cm³ desztillált víz

Tetrahymena tápoldat: 1 g tripton

0,1 g élesztőkivonat

100 ml csapvíz

3.4.3 A tesztekhez felhasznált szennyező anyagok

3.4.3.1. Diesel olaj

A frakcionált desztilláció során keletkező gázolaj termékcsoport további finomításával állítják elő a Diesel olajat, mint üzemanyagot.

Fizikai tulajdonságok

10. táblázat A Diesel olaj fizikai jellemzői*

Fizikai jellemző	Érték
Forráspont	180-380 °C

Olvadáspont	< -20°C
Lobbanáspont	40-65 °C
Dinamikai viszkozitás	2,64 Pas
Sűrűség	0,8-0,9 g/cm ³
Log Kow	3-5

* Leitgib, 2002

Kémiai összetétel

Fő komponensek: paraffinok, gyűrűs komponensek. Mellék alkotóvegyületek: heteroatomot (O, N, S) tartalmazó vegyületek (fenol, naftalinsav, szulfidok, tiol, tiofén).

Adalékanyagok: kopásgátlók, antioxidánsok, ülepedésgátlók, fémpasszívátor.

Ökológiai toxicitás

A kőolajszármazékok különböző összetevői eltérő hatásokat fejthetnek ki a talajban. A telített szénhidrogének jelentős része könnyen lebomlik a talaj bontó mikroflórájának köszönhetően. Ezek a vegyületek gyakran az oxigéntől való elzárással veszélyeztetik az ökoszisztémát, s a lebontásuk szempontjából leghatásosabb biooxidatív anyagcsere-aktivitást szorítják háttérbe.

Mobilitás

A mozgási folyamat létrejöhet a szennyezőanyag vizes fázisban oldott állapotában, vagy amikor önálló folyadékfázist és gőzfázist alkot. A talajvízben oldott szennyezőanyagok mozgása a talajban több fizikai folyamateredménye. Ha mobilis vízfázisról van szó, akkor a szennyezőanyag áramlása dominál.

A talajvízáramlás irányához képest ezek vándorlása lehet longitudinális (azzal egyirányú) illetve transzverzális (arra merőlegesen lefelé). Ha immobilis a vízfázis, akkor az oldott szennyezőanyag diffúzióval terjedhet. Ennek sebességét a koncentrációkülönbség, a távolságkülönbség és a molekulák átlagsebessége adja meg.

Ha a szennyezőanyag önálló folyadékfázist alkot és mennyisége nagyobb, mint a telítetlen talajréteg szénhidrogén-visszatartó kapacitása, akkor a szennyezőanyag a talajvízszintig hatolhat le. Ez nemcsak a kapilláris zóna szabad pórusterét tölti ki, hanem fokozatosan szétterülve a talajvízszint felett összefüggő olajlencsét alkothat. Mozgását a talajvíz áramlási iránya és sebessége határozza meg. Mivel viszkozitása nagyobb és sűrűsége kisebb, mint a vízé, lassabban áramlik. A talajvízszint periodikus ingadozása következtében további talajrétegek szennyeződhetnek. Ilyenkor a felszínen úszó nem vizes fázis követi az ingadozó vízszintet, s kapcsolatba kerül a korábban el nem szennyezett talajrétegekkel. Így a

szabad fázisú szénhidrogén mennyisége csökken, a szilárd fázishoz kötött szennyezés mennyisége pedig nő.

A gőzfázisú szénhidrogének áramlását a póruslevegő szabja meg. Ha a póruslevegő áramlása korlátozott, akkor a szénhidrogéngőzök diffúzióval terjednek, mely a gázmolekulák egymással való összeütközésének eredménye. Ha viszont jelentős levegőáramlásról van szó, akkor a diszperzió válik dominánssá.

Megoszlás

A szennyezőanyagok megoszlása a felszín alatti rendszerekben létrejöhet szilárd-gáz, szilárd-folyadék, folyadék-gáz, folyadék-folyadék fázisok között.

A talaj szilárd fázisához adszorpcióval vagy abszorpcióval kötődnek a szerves szennyezőanyagok. A gőzformájú illékony szennyezőanyagok a talajszemcsékhez adszorbeálódnak, ezáltal csökkentik a gőzfázisú áramlást. Folyadékfázis esetén a talajszemcsékhez való adszorpció mértéke függ a szennyezőanyag vízoldhatóságától, oktanol-víz megoszlási hányadostól (K_{ow}), a polaritásától és a molekulatömegétől.

Általában egy vegyület minél jobban oldódik a vízben, annál kevésbé adszorbeálódik a talaj szilárd felületén.

A kapilláris zóna szabad pórusterét tölti ki, hanem fokozatosan szétterülve a talajvízszint felett összefüggő olajlencsét alkothat. Mozgását a talajvíz áramlási iránya és sebessége határozza meg. Mivel viszkozitása nagyobb és sűrűsége kisebb, mint a vízé, lassabban áramlik. A talajvízszint periodikus ingadozása következtében további talajrétegek szennyeződhetnek.

Ilyenkor a felszínen úszó nem vizes fázis követi az ingadozó vízszintet, s kapcsolatba kerül a korábban el nem szennyezett talajrétegekkel. Így a szabad fázisú szénhidrogén mennyisége csökken, a szilárd fázishoz kötött szennyezés mennyisége pedig nő.

Kémiai átalakulás

A kőolajszármazékok kémiai lebomlása nem jelentős, mivel a szénhidrogének kémiai affinitása kicsi. Ezek az anyagok a talajban azonban számos enzimes és kémiai folyamatnak vannak kitéve. Hidrolízis során a szennyező komponensek reakcióba lépnek a vízzel és alkohol képződik. A hidrolitikus bomlást több talajalkotó (humuszanyag, foszfát, bikarbonát) és a rajta megkötött exoenzimek katalizálják.

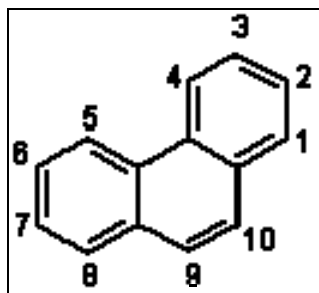
Oxidáció/redukció esetén elektrontranszport jön létre a szénhidrogén és a talaj komponensei között.

Szubsztitúció során nukleofil molekula lép reakcióba a szénhidrogén molekulával.

Biológiai bonthatóság

A biodegradáció során a mikroorganizmusok enzimkatalizált reakciókban alakítják át a szerves anyagokat, melyek végül a növények számára ismét felvehető szerves állapotba kerülnek. Teljes biodegradáció esetén végtermékként víz és szén-dioxid képződik. A biodegradáció nem egyféle mikroorganizmushoz, hanem mikroorganizmus közösség működésének az eredménye. A folyamat alapfeltétele tehát, hogy a mikroorganizmusok a hozzáférhető, oldott állapotban lévő szennyezőanyagokat szubsztrátként vagy koszubsztrátként fel tudják használni az adott feltételek mellett. (Leitgib, 2002)

3.4.3.2 Fenantrén



11. ábra A fenantrén képlete

Ez a policiklusos aromás szénhidrogén (PAH-ok) számos természetes anyag szerkezeti váza; pl. morfin, szterinek, epesavak, gyantasavak, digitálisz-glikozidok, szapoinok. A fenantrén molekulavegyületet képez pikrinsavval és hasonló nitrovegyületekkel. Vegyiparban főleg gyomirtók és gyógyszerek szintéziséhez használják. Előfordulása főként a kőszénkátrányban (5%) az izomer antracénnel együtt.

Fizikai tulajdonságai

11. táblázat A fenantrén fizikai jellemzői*

Fizikai jellemző	Érték
Forráspont	340 °C
Olvadáspont	100 °C
Relatív sűrűség (víz=1)	1,0
Oldékonyság vízben	nem oldódik
Gőznyomás (173°C-on)	1 Hgmm
Log K _{ow}	4,57

* Bruckner,1977

Ökológiai toxicitás

A PAH-ok a szerves anyagok tökéletlen égésekor keletkező toxikus, mutagén illetve karcinogén anyagok. Az irodalomban toxicitására vonatkozóan talált adatokat a 10. táblázat tartalmazza.

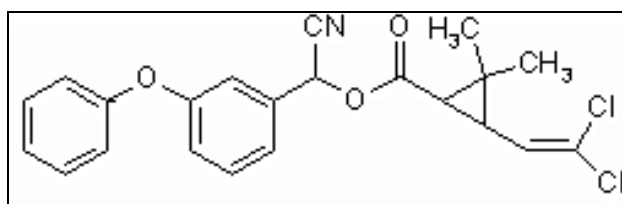
A táplálékláncba bekapcsolódva az emberre is veszélyesek, mivel a zsírszövetekbe jutva elraktározódnak. A PAH-oknak igen erős karcinogén és mutagén hatása is van, melyek azonban fotooxidáció és a biodegradáció során módosulhatnak.

A rossz sejtranzformáció kialakulásának, és ezzel a normális sejt rákos sejté válásának döntő lépése a PAH-ok reakciója a genetikai információt kódoló DNS-el. A PAH-ok elsősorban az epoxidjukon keresztül tudnak a DNS-hez kapcsolódni.

A szervezetbe főleg a légutakon keresztül kerülnek, mert alacsony gőznyomásuk miatt a levegőben (főként a háromnál több gyűrűből álló vegyületek) a szilárd részecskék felületén abszorbeálódnak. Talajba száraz és nedves ülepedéssel juthatnak PAH-ok, ahol szerves alkotókhöz és talajszemcsékhez kötődnek. (Fekete, 1993)

Amerikai irodalmi adatok szerint, *Neanthes arenaceodentata* fajon, tengervízi körülmények között végzett 96 órás vizsgálatok 0,6 ppm TL_m értéket mutattak. (Verschueren, 1983)

3.4.3.3 Cypermetrin



12. ábra A cypermetrin képlete

A β -cypermetrin CHINMIX 5 SC néven növényvédőszerként kerül a forgalomba.

Fizikai tulajdonságai

12. táblázat A cypermetrin fizikai jellemzői*

Fizikai jellemző	Érték
Olvadáspont	80,5 °C
Sűrűség	1,25 g/cm
Oldékonyság vízben (20°C-on)	4x10 ⁻³ mg/l
Gőznyomás (20°C-on)	3,07x10 ⁻⁹ Hgmm
Log K _{ow}	6,6

*www.fjokk.hu, 2004

Ökológiai toxicitás

A CHINMIX 5 SC erősen mérgező a vízi élőlényekre. A technikai cypermetrinnel 96 óra alatt, több halfajon mért LC₅₀ vizsgálati eredmények 0,4 – 3 µg/lit. közötti értékeket mutattak.

A cypermetrinnek alacsony a toxicitása emlősökre és madarakra. Viszont a 0,02 µg/méh toxicitási értékkel (24 óra) rendkívül mérgező a méhekre. (Cypermethrin A, 1989)

Biológiai lebonthatóság

A cypermetrin cisz-izomérjének felezési ideje talajban kb. 4 hét, a transz-izomér felezési ideje 2 hét. A cypermetrin lebomlása nedves állapotban lassabb, mint száraz körülmények között. Vízben, savas pH-s közegben a cypermetrin felezési ideje egy esetleg több év volt, jelentősen rövidebb volt 7-es pH-nál, és szinte csak percekre tehető 11-es pH esetén (mind 25 °C-on mérve). Természetes vizekben, amelynek a pH-ja 8 körül van, a várható felezési idő kb. 3 hét 25 °C-on.

Biológiai felhalmozódás

A cypermetrin biológiai akkumulálódása vízi szervezetekben és emlősökben nem várható. (Cypermethrin B, 1989)

Mobilitás

Alacsony vízdoldhatóságának és a talajrészecskékhez történő gyors kötődésének köszönhetően a cypermetrin nem mobil a talajban. A cypermetrinnek a víz segítségével lefelé történő elmozdulása is korlátozott, mivel erős a felületi részekhez való affinitása, különösen, ahol magas a talaj szervesanyag-tartalma.

4. Talajra alkalmas ökotoxikológiai módszerek fejlesztése

Ebben a fejezetben a módszerfejlesztések lényegét, a kapott eredményeket és azok értékelését adom meg.

Munkám vegyi anyagok környezeti kockázatának mérése tárgykörbe tartozik, azon belül is a környezetünket szennyező vegyi anyagok hatásának mérésével, a hatások mérésére alkalmas laboratóriumi biotesztek fejlesztésével foglalkoztam.

Kísérleti koncepciómmal három környezeti scenáriót modelleztem, és a három scenárióban kialakuló kockázatokat mértem. A modelljeim minden esetben a talaj szennyezettségét állították a középpontba, ennek megfelelően az alábbi scenáriók kockázatának jellemzésére alkalmas bioteszteket vizsgáltam. (LOKKOCK B, 2005)

1. A talaj, mint élőhely: a talajban élő bonyolult közösségek a földi ökoszisztémában kétszeresen is alapvető szerepet töltenek be: itt történik az elemek geobiokémiai ciklusának, az elemkörforgalomnak a bezárása, tehát a talaj ökoszisztémájának genetikai és biokémiai képessége és állapota meghatározó az elemkörforgalom egészsége szempontjából. A másik, természetesen az elemkörforgalmakkal szorosan összefüggő elvárás a talajtól a tápláléklánc alapját képező elsődleges termelők, a növényi biomassza létrehozása, mind a természetes, mind az agroökoszisztémákban. A talaj, mint élőhely jellemzésére olyan tesztesztet fejlesztettem, melyek lehetővé teszik a tesztorganizmus és a talaj közvetlen érintkezését, un. interaktív vagy direkt-kontakt tesztesztet

2. A talaj, mint a talajvizet veszélyeztető szennyeződés forrása és visszatartója. Ez a scenárió a talaj-talajvíz kölcsönhatásból, a szennyezőanyag megoszlásából és a vizes talajfázisba kerüléséből adódik és a kockázat jellemzésére a talaj vízfázisában élni képes egysejtű organizmusokat alkalmaztam.

3. A talajt, mint felszíni vizet szennyező elem: a talajerózió és a talajvíz felszíni vízbe jutása is jellemző transzportútvonala. A felszíni vízbe jutott szennyezőanyagok hatását egy vízi élőlényel, a *Daphniával* mértem.

A munkámban felhasznált metodika az volt, hogy Diesel olajjal, egy jól ismert hatású szennyezőanyaggal, valamint egy kiválasztott policiklikus aromás szénhidrogénnel; a fenantrénnel és egy kiterjedten alkalmazott peszticiddel; a cypermetrinnel a különböző koncentrációban szennyezett talajok tesztorganizmusokra gyakorolt hatását mértem a dózis-hatás görbe felvételével az említett scenárióknak megfelelően szilárd talajjal, vagy abból készült csurgalékkal/kivonattal.

A koncentráció-hatás összefüggés ábrázolásával lehetővé válik, az ökotoxikológiában elterjedten alkalmazott **EC** (Effect Concentration), vagyis hatásos koncentráció-értékek és **ED** (Effect Dose), vagyis hatásos dózis-értékek megállapítása. A kísérlet során kapott adatokat táblázatos formában vagy diagramokon ábrázoltam, ezekből a 20 és 50 %-os gátlások értékeit a Microcal Origin 6.0 programmal határoztam meg.

A kiválasztott állati tesztorganizmusok által vizsgálhatóvá válik a talaj szennyezettségéből adódó három legfontosabb kockázat:

- a talaj, mint élőhely: *Tetrahymena*, *Collembola*

- a talajból a felszín alatti vízbe mosódó szennyezettség: *Tetrahymena* vizes közegben/csurgalékban

- a talajból erózióval, esővel vagy talajvízzel a felszíni vízbe mosódó szennyezőanyag: *Daphnia* kivonatban.

A *Tetrahymena pyriformis*, egy, a talajban és a talaj pórusvizében egyaránt élő protozoa; *Folsomia candida* (továbbiakban *Collembola*), mely a talaj felszínén, illetve annak pórusaiban élő apró rovar; valamint a *Daphnia magna*, mely kísérleteimben a vízi ökoszisztémát képviselő vízi rákfajta. Összehasonlításul a talaj légzését is mértem. Ez egy olyan végpont, amely a talajban élő összes élőlény együttes reakciójáról ad felvilágosítást. Ennek mérése zárt palack tesztben történt, a mért végpont alapján a talaj általános állapotát, biokémiai kapacitását, bontóképességét jellemzi.

Kiértékeléseim során számos irodalmi adatot használtam fel. A külföldi irodalomban **MPC** (Maximum Permissible Concentrations), vagyis maximálisan megengedhető koncentráció értékeket találtam, melyeket számos esetben összevettem a magyarországi **B értékekkel**.

A B szennyezettségi határérték a felszín alatti víznél az ivóvízminőség és a vízi ökoszisztéma igényei, földtani közeg esetében a talajok multifunkcionalitásának és a felszín alatti vizek szennyezéssel szembeni érzékenységének figyelembevételével meghatározott kockázatos anyag koncentrációt jelenti. A továbbiakban ezek, rövidítését használom.

4.1 A talaj, mint élőhely szennyezettségének jellemzése toxicitási tesztekkel

A talajt szennyező vegyi anyagok kockázatának megítéléséhez legalább három trófikus szintről származó tesztorganizmus eredményeit kell felhasználnunk az ökoszisztémára károsan még nem ható koncentráció megállapításához. Az eszköztárunkban igen kevés olyan teszt áll rendelkezésünkre, mely talajlakó állatok a szennyezett talajra adott válaszát mérné és értékelné, ezért hiánypótló ezeknek az állati teszteknek a fejlesztése.

4.1.1 Diesel olajjal szennyezett talaj hatása a *Collembola* túlélésére

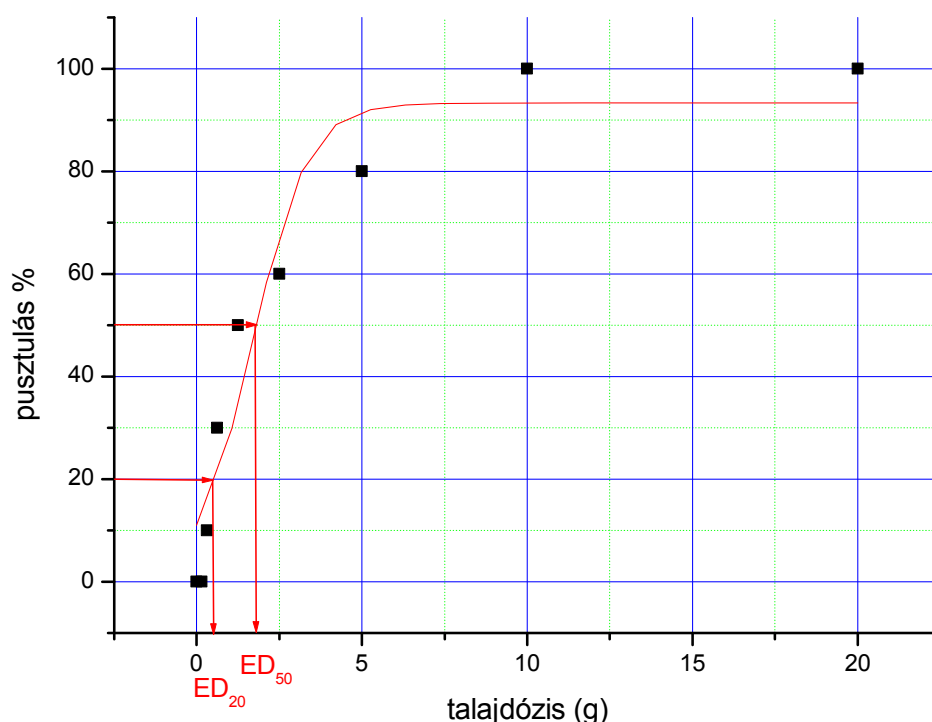
A *Collembola* az ugróvillások rendjébe tartozó, ősi, ugróvillás. Talajlakó, m²-enként akár 100 000 db is található belőle. Hasi légzőtömlőjén keresztül belégzéssel és bőrkontakt útján mérgeződik.

Választásom azért esett erre az élőlényre, mert könnyű vele dolgozni, fenntartása, használata egyszerű és olcsó. Egyetlen probléma, mely alkalmazásánál felmerül, hogy az akut teszt is 5–10 napig tart, a krónikus pedig három hétig.

13. táblázat Diesel olaj koncentrációkhoz tartozó *Collembola* pusztulási százalékok akut tesztben mérve

Bemért szennyezett talaj (g)	Hígításhoz használt OECD talaj (g)	Diesel olaj koncentráció a talajban (ppm)	Teszthez felhasznált egyedek száma (db)	Teszt során elpusztult egyedek száma (db)	Pusztulási %
20	0	20 000	10	10	100
10	10	10 000	10	10	100
5	15	5 000	10	8	80
2,5	17,5	2 500	10	6	60
1,25	18,75	1 250	10	5	50
0	20	0	10	0	0
20	0	2 500	10	6	60
10	10	1 250	10	5	50
5	15	625,0	10	3	30
2,5	17,5	312,5	10	1	10
1,25	18,75	156,2	10	0	0
0	20	0	10	0	0

A tesztek végpontjának mérése (pusztulás) után az eredményekből Microcal Origin 6.0 program segítségével felvettem a dózis-hatás görbét.



13. ábra Talajt szennyező Diesel olaj hatása Collembollára

A 13. ábrán látható dózis-hatás görbéről leolvasott ED₂₀ és ED₅₀ értékek azt adják meg, hogy mekkora az a talajdózis, mely a tesztorganizmusok 20-, illetve 50%-át elpusztítja. Ezeket az értékeket a felvett görbéről az y tengely 20 és 50 értékeinek az x tengelyre vetítésével olvastam le. Az 14. táblázatban összefoglaltam a leolvasott, 20 és 50%-os gátlást, illetve pusztulást okozó szennyezett talajmennyiségét és a szennyezettség mértékének pontos ismerete alapján az ebből számított, Diesel olaj koncentrációkat. A talajminta toxicitást nem csak számértékkel, de a toxicitás mértékének magadásával is jellemzem.

14. táblázat Talajt szennyező Diesel olaj toxicitása a Collembollára

	Hatást mutató szennyezett talaj mennyisége (g)	Számított hatást mutató Diesel olaj koncentráció (ppm)	Toxicitás jellemzése
ED ₂₀	0,5	500	nagyon toxikus
ED ₅₀	1,8	1800	nagyon toxikus

15. táblázat Toxicitási adatok összehasonlítása határértékekkel, Diesel olajra

ED ₅₀	B érték talajra* (össz. TPH-ra)	Beavatkozási értékek
1800 ppm	100 ppm	1000 / 3000 / 5000 ppm

*10/2000 Kormány rendelet, 2000

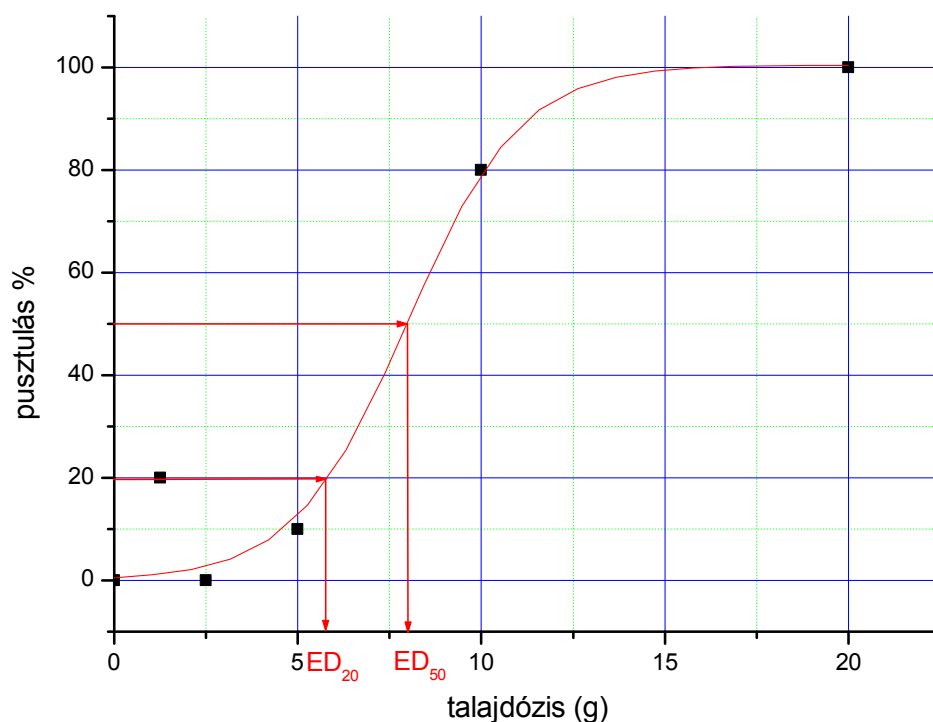
4.1.2 Fenantrénnel szennyezett talaj hatása a *Collembola* túlélésére

Tapasztalataink szerint elsősorban a Diesel olaj illékony komponensei hatnak a *Collembollára*, mert annak hasi tömlőjével folyó légzése az egyik legexponáltabb életfunkciója. A fenantrén egy policiklikus aromás szénhidrogén, melynek *Collembollára* gyakorolt hatása nem ismert, de feltételezhető, hogy nem illékony vegyületként kevésbé lesz toxikus a *Collembollára*. Céloom az EC₂₀ és EC₅₀ értékek kimérése volt.

16. táblázat Talaj növekvő fenantrén koncentrációjának hatása a *Collembola* pusztulására

Bemért szennyezett talaj (g)	Hígításhoz használt OECD talaj (g)	Fenantrén koncentráció a talajban (ppm)	Teszthez felhasznált egyedek száma (db)	Teszt során elpusztult egyedek száma (db)	Pusztulási %
20	0	5	10	0	0
10	10	2,5	10	2	20
5	15	1,25	10	3	30
2,5	17,5	0,625	10	4	40
1,25	18,75	0,3125	10	0	0
0	20	0	10	0	0
20	0	50	10	1	10
10	10	25	10	3	30
5	15	12,5	10	2	20
2,5	17,5	6,25	10	1	10
1,25	18,75	3,125	10	1	10
0	20	0	10	0	0
20	0	500	10	10	100
10	10	250	10	8	80
5	15	125	10	1	10
2,5	17,5	62,5	10	0	0
1,250	18,75	31,25	10	2	20
0	20	0	10	0	0

Az eredmények alátámasztják kezdeti feltételezésemet, hogy a fenantrén kevésbé toxikus a *Collembollára*. Három lépésben tudtam kimérni a hatást mutató koncentrációt, az 5 és 50 ppm-es értékkel indítva a hígítási sort, csak szórást mértem, valódi pusztulás-növekedést nem. Mindazonáltal érdekes lenne a későbbiekben megvizsgálni a fenantrén krónikus hatását is, mert a szokásosnál nagyobb „szórásértékek” arra vallanak, hogy a végpontban nem egyértelműen jelentkező hatások bizonyára léteznek. A pusztulásnál érzékenyebb végpont adhat erre a kérdésre választ.



14. ábra Fenantrénnel szennyezett talaj dózis-hatás görbéje *Collembola* tesztorganizmussal

A legnagyobb fenantrén koncentrációjú talaj szabályos S-alakú dózis-hatás görbét adott, melyről leolvastam az ED₂₀ és ED₅₀ értékeket, amelyeket átszámítottam fenantrén koncentrációra a talaj fenantrén tartalmának ismeretében.

17. táblázat Talajt szennyező fenantrén akut toxicitása *Collembollára*

	Hatást mutató szennyezett talaj mennyisége (g)	Számított hatást mutató fenantrén koncentráció (ppm)	Toxicitás jellemzése
ED ₂₀	5,8	145	Enyhén toxikus
ED ₅₀	8	200	Enyhén toxikus

18. táblázat Toxicitási adatok összehasonlítása fenantrénre

ED ₅₀	Max. megengedhető MPC érték*	B érték talajra** (össz. PAH-ra)	Beavatkozási érték
200 ppm	50 ppm	1 ppm	50 / 200 / 600

*Crommentuijn,2000 **10/2000 Kormány rendelet,2000

A teszt kis érzékenységet mutatott fenantrénre, de ez az érték nagyságrendben megegyezik a humán egészségkockázatokra kapott beavatkozási értékeke nagyságrendjével.

4.1.3 Cypermetrinnel szennyezett talaj hatása a Collembollára

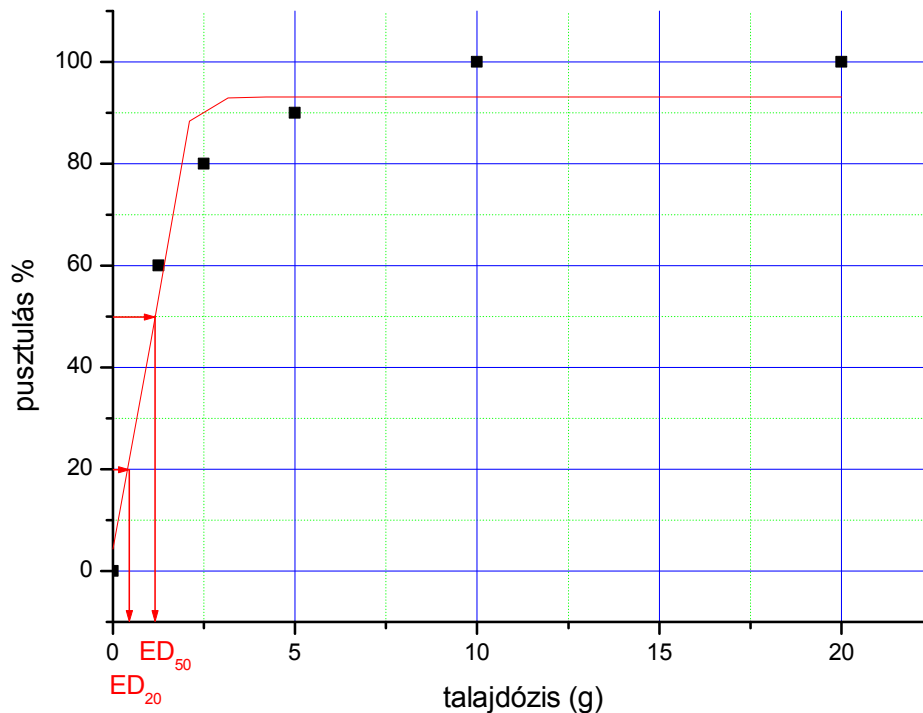
A cypermetrin az egyik legnagyobb mennyiségben használt rovarölőszer Magyarországon. Szúnyogirtásra is ezt használják. Várható, hogy a *Collembola*, mely szintén rovar, érzékeny lesz erre a szerre. Az erre vonatkozó irodalmi adatok 0,02 µg/méh toxicitási értéket (24 óra) említenek, mely rendkívül mérgezőnek bizonyult. (Cypermethrin, 1989)

Két koncentrációtartomány hatását pásztáztam végig *Collembollával*, és e két tartományban kapott eredmények tökéletesen illeszkedve egymáshoz lehetővé tették a cypermetrin EC₂₀ és EC₅₀ értékének meghatározását *Collembollára*.

19. táblázat Talajt szennyező cypermetrin toxikus hatása a *Collembollára*

Bemért szennyezett talaj (g)	Hígításhoz használt OECD talaj (g)	Cypermetrin koncentráció a talajban (ppm)	Teszthez felhasznált egyedek száma (db)	Teszt során elpusztult egyedek száma (db)	Pusztulási %
20	0	5	10	10	100
10	10	2,5	10	10	100
5	15	1,25	10	9	90
2,5	17,5	0,625	10	8	80
1,25	18,75	0,3125	10	6	60
0	20	0	10	0	0
20	0	50	10	10	100
10	10	25	10	10	100
5	15	12,5	10	10	100
2,5	17,5	6,25	10	10	100
1,25	18,75	3,125	10	10	100
0	20	0	10	0	0

A 19. táblázat adatait a szokásos dózis-hatás görbén ábrázoltam és onnan olvastam le az ED₂₀ és ED₅₀ értékeket, melyekből kiszámítottam a talajt szennyező, a talajhoz kötött cypermetrin hatásos koncentrációit.



15. ábra Cypermetrinnel szennyezett talaj hatása *Collembollára*

10. táblázat Cypermetrin dózis-hatás görbe összefoglaló jellemzése

	Hatást mutató szennyezett talaj mennyisége (g)	Számított hatást mutató cypermetrin koncentráció (ppm)	Toxicitás jellemzése
ED ₂₀	5,8	1	Nagyon toxikus
ED ₅₀	12	3	Nagyon toxikus

11. táblázat Toxicitási adatok összehasonlítása cypermetrinre

ED ₅₀	MPC érték*	B érték (össz. növényvédő szerre)**	Beavatkozási érték
3 ppm	39 ppm	0,01 ppm	1 / 30 / 100

* Crommentuijn,2000 ** 10/2000 Kormány rendelet, 2000

A cypermetrin talajban és vízben bomlékony, emiatt a hatásos koncentrációk meghatározása problémát okozhat. A tesztelés idejének és a cypermetrin bomlási együttthatójának figyelembevételével lehetne a talaj toxicitását, illetve kockázatát előre jelezni. A hatás időbeli lefutását is érdemes lenne kimérni.

Összefoglaló értékelés a *Collembola* tesztorganizmusról

A collembollával direkt érintkezést biztosító tesztek végeztem, letalitás végpont mérése mellett. A *Collembola* érzékenységről a vizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy a Diesel olajra bizonyult a legérzékenyebbnek, annak illékonyága miatt, ezt követi a cypermetrin, míg a fenantrénre csak igen nagy koncentrációban mutatott érzékenységet.

A tesztek végzése során tapasztaltak alapján fel kell hívni a figyelmet a fenantrén hatásának mérésakor tapasztalt nagy szórásértékekre és a cypermetrin talajban történő gyors bomlásának hatására.

A teszt végpontja jelenleg a letalitás, lehetséges, hogy lenne érzékenyebb végpont is, pl. légzés, hőtermelés, de ezek mérése bonyolult. Egyelőre nincs rájuk kidolgozott mérési technika. Tehát a *Collembola* használható az illó frakciókat is tartalmazó szénhidrogénekre, a szelektíven ható cypermetrinre, de akut tesztben nem érzékeny a fenantrénre.

Javaslatok

1. *Collembola* alkalmazása más peszticidekre és illékony oldószerekre.
2. A fenantrén hatásának vizsgálata más, érzékenyebb tesztorganizmusokkal és végpontokkal.
3. A *Collembola* teszt szabványosítása talaj, mint élőhely vizsgálatára és talajszennyező anyagok általános kockázatának, PNEC értékének kimérésére, vagyis határértékképzésre.
4. Olyan végpont keresése, mely rövidebb idő alatt is értékelhető választ produkál.

4.1.4 Diesel olajjal szennyezett talaj hatása *Tetrahymena pyriformis*ra

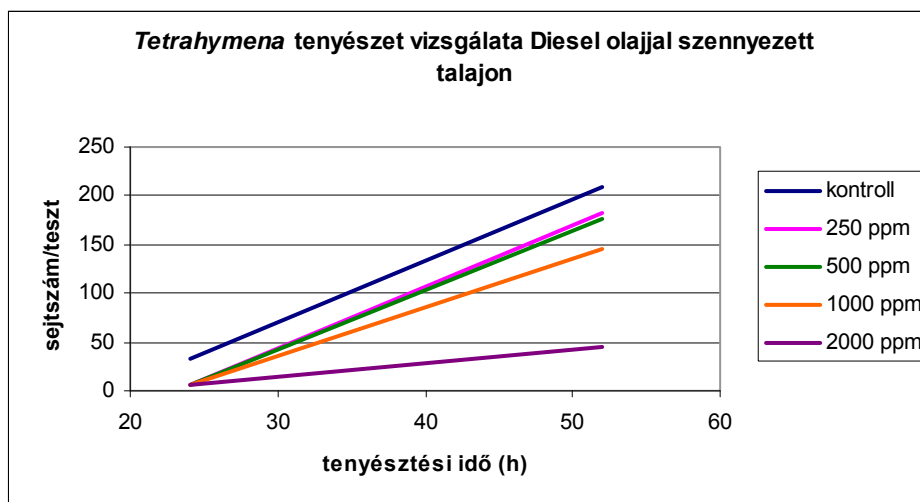
A *Tetrahymena pyriformis* egy mikroszkopikus egysejtű, állati tesztorganizmus, mely a talaj pórusvizeiben él. Azért választottam, mert egysejtű, gyorsan szaporodik, ugyanakkor reprezentálja az állati trófikus szintet. Vizes közegből veszi fel a táplálékát, membránnal körülhatárolt, így teljes test felületén érintkezik a szennyezőanyaggal, ezért feltehetően érzékeny.

A teszt végpontja a fenantrén hatása a *Tetrahymena* szaporodására, vagyis hatása az élő sejt szám növekedésére. Ezt mikroszkópos számlálással határoztam meg (12. táblázat).

12. táblázat A mikroszkópos sejt szám a Diesel olaj koncentrációjának függvényében

Tenyésztési idő [h]	Élő sejt szám/ teszt			
	kontroll	Fenantrén		
		5 ppm	250 ppm	500 ppm
0	4	2	2	3
24	21	7	6	6
52	190	115	74	43

A sejt számlálás eredményeiből Microsoft Excel segítségével felvettem a tenyésztési idő-sejt szám/teszt egyeneseket, majd leolvastam azok meredekségét.



16. ábra *Tetrahymena* sejt szám alakulása különböző Diesel olaj-koncentrációk jelenlétében

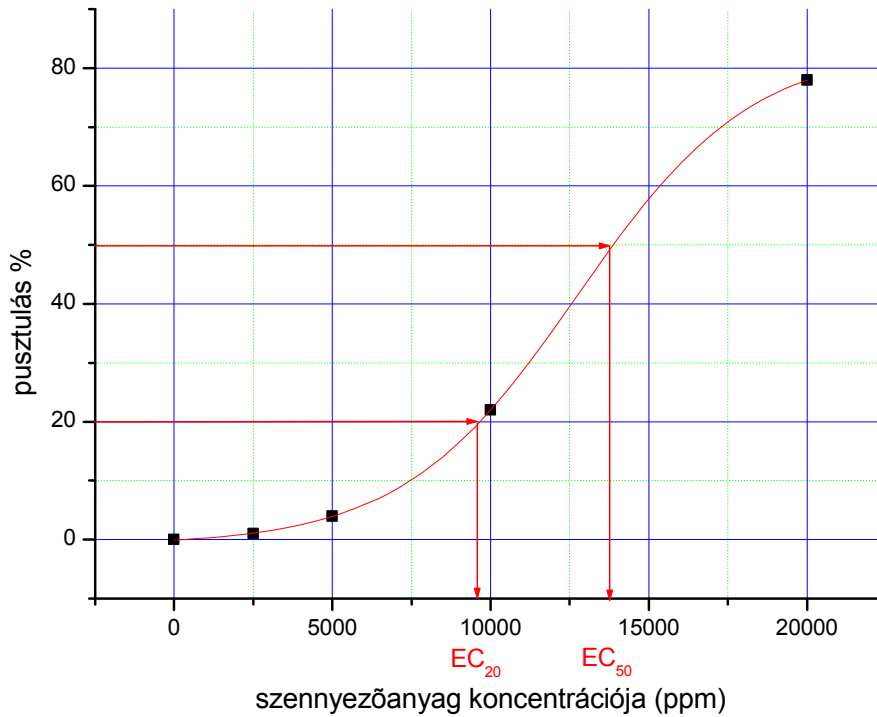
A végpont (sejt szám) arányos a koncentrációval és az idővel. Az egyenesek meredekségéből látható, hogy 5 ppm fenantrén a talajban már szignifikáns csökkenést okoz a *Tetrahymena* sejt számában. A pusztulás-fenantrén koncentráció a talajban összefüggés alapján az EC₂₀ 5 ppm alatt, az EC₅₀ 5 és 250 ppm között van.

3. egyenlet *Tetrahymena* pusztulási százalék számításának képlete

$$pusztulás(\%) = \frac{a_{kontroll} - a_{min\ ta}}{a_{kontroll}} * 100$$

13. táblázat *Tetrahymena* sejtszáma talajt szennyező Diesel olaj hatására

Diesel olaj					
koncentráció	kontroll	2 500 ppm	5 000 ppm	10 000 ppm	20 000 ppm
meredekség	6,3571	6,2857	6,1071	4,9643	1,3929
pusztulás (%)	0	1	4	22	78



17. ábra *Tetrahymen* pusztulása talajt szennyező Diesel olaj koncentráció függvényében

14. táblázat Diesel olaj koncentráció-idő görbe értékelése

	Hatást mutató fenantrén koncentráció (ppm)
EC ₂₀	9 576
EC ₅₀	13 780

15. táblázat Toxicitási adatok összehasonlítása Diesel olajra

	Mért érték	MPC érték*	B érték**
ED ₅₀	13 780 ppm	39 ppm	100 ppm

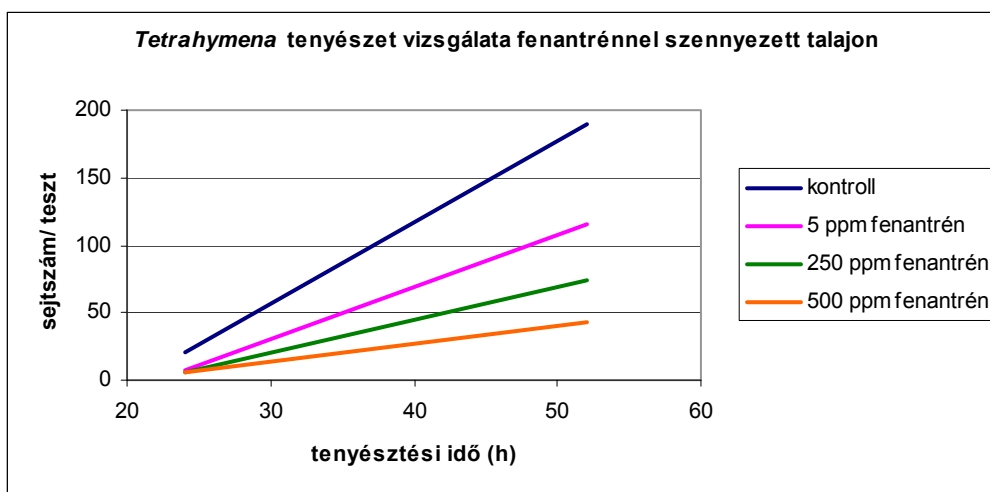
* Crommentuijn,2000 ** 10/2000 Kormány rendelet

A talajt szennyező Diesel olajra nem érzékeny a *Tetrahymena*, az egyensúlyi koncentrációkhoz képest további toxicitás-pufferolás tapasztalható a háromfázisú talajban. Ez azt is jelenti, hogy az élőhelyén a *Tetrahymena* a talajvízbe átkerült szennyezőanyagoknak van jobban kitéve. Kísérleteimben is megfigyeltem, hogy az aktív sejtek „elbújnak” az oldott toxikus szennyezőanyag elől a talaj mikroszerkezetébe, maguk köré gyűjtve a talajszemcséket.

4.1.5 Fenantrénnel szennyezett talaj hatása a *Tetrahymena pyriformis*-ra

16. táblázat A mikroszkópos sejtszám a fenantrén koncentráció függvényében

Tenyésztési idő [h]	Élő sejtszám/ teszt			
	kontroll	Fenantrén		
		5 ppm	250 ppm	500 ppm
0	4	2	2	3
24	21	7	6	6
52	190	115	74	43

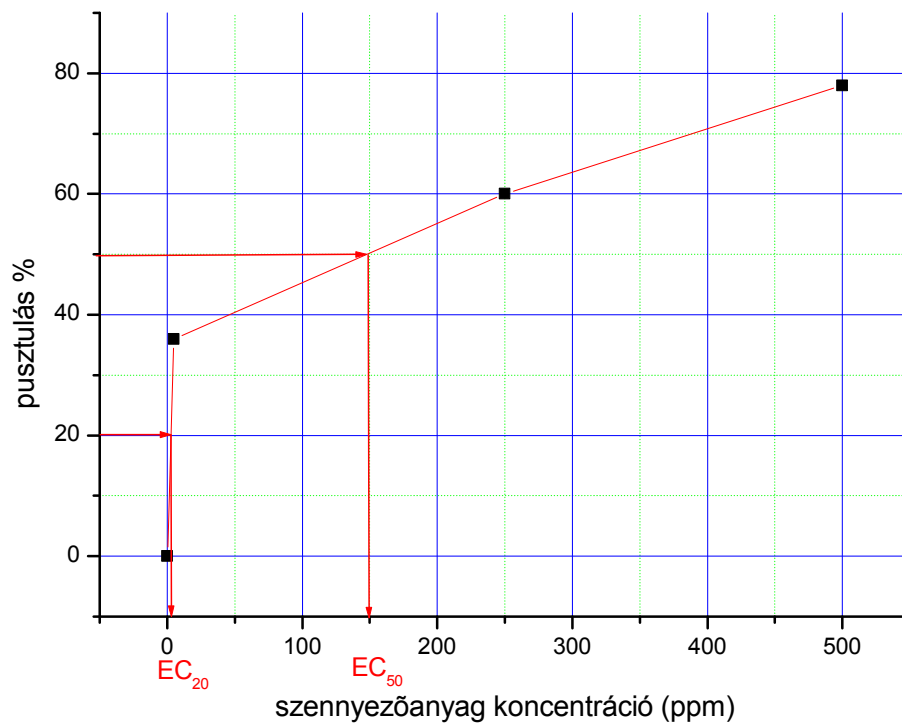


18. ábra *Tetrahymena* sejtszám alakulása különböző fenantrén-koncentrációk jelenlétében

A sejtszámok arányosak a fenantrén koncentrációval és az idővel.

17. táblázat *Tetrahymena* sejtszáma talajt szennyező fenantrén hatására

Fenantrén				
koncentráció	kontroll	5 ppm	250 ppm	500 ppm
meredekség	6,0357	3,8571	2,4286	1,3214
pusztulás (%)	0	35	60	78



19. ábra Talajt szennyező fenantrén koncentráció-hatás görbéje *Tetrahymenával* mérve

18. táblázat Talajt szennyező fenantrén hatásos koncentrációi *Tetrahymenára*

	Hatást mutató fenantrén koncentráció (ppm)
EC ₂₀	3
EC ₅₀	150

19. táblázat Toxicitási adatok összehasonlítása fenantrénre

	Mért érték	MPC érték**	B érték talajra* (össz. PAH-ra)
EC ₅₀	150 ppm	50 ppm	1 ppm

* 10/2000 Kormány rendelet, 2000 **Crommentuijn, 2000

A mért EC₅₀ érték alapján elmondhatjuk, hogy a *Tetrahymena* érzékeny a fenantrénre.

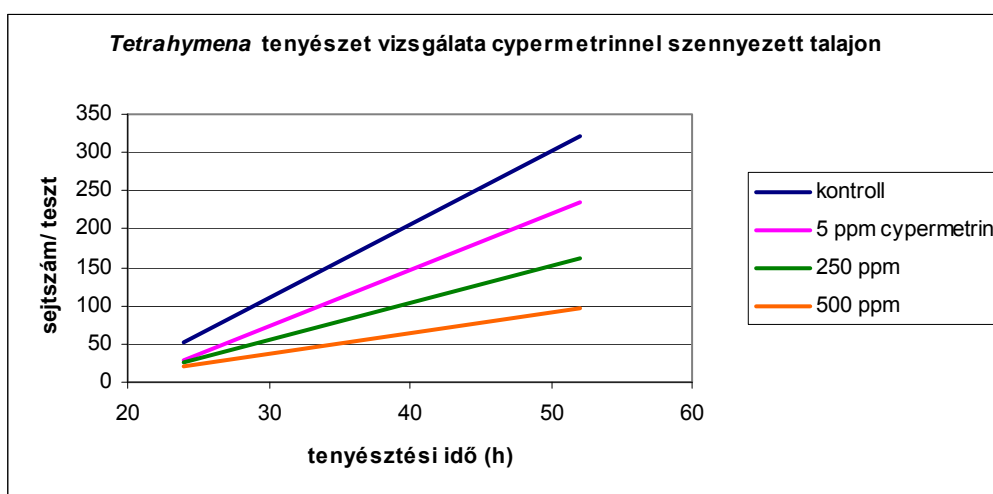
4.1.6 Cypermetrinnel szennyezett talaj hatása *Tetrahymena pyriformisra*

A *Tetrahymena* jó általános érzékenységgel rendelkezik, bár anyagfelvétele és receptorai nem hasonlíthatók össze a bonyolult szervezetű tesztorganizmusokkal, mint a *Collembola*.

Előnye, hogy mind talajban, mind talajvízben él, tehát a talaj ökoszisztémáját jól reprezentáló, egysejtű állatról van szó.

20. táblázat *Tetrahymena* sejtszáma növekvő koncentrációban cypermetrinnel szennyezett talaj hatására

Tenyésztési idő [h]	Sejtszám/ teszt			
	kontroll	Cypermetrin		
		5 ppm	250 ppm	500 ppm
0	5	6	6	8
24	51	29	25	22
52	321	234	162	97



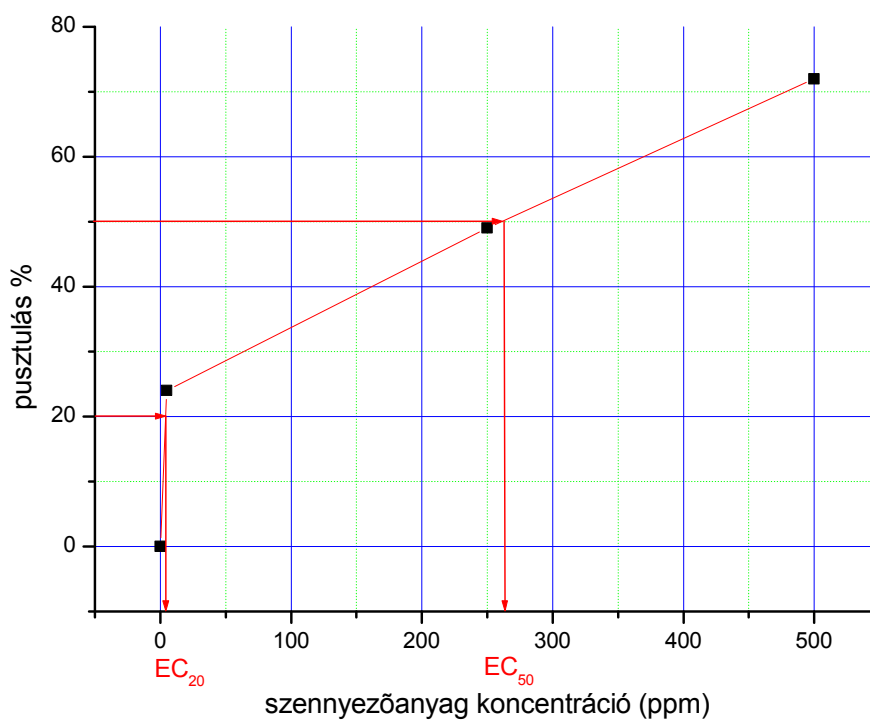
20. ábra *Tetrahymena* sejtszám alakulása különböző szennyezőanyag koncentrációk függvényében

A sejtszámok arányosak mind a cypermetrin koncentrációval, mind pedig az idővel.

21. táblázat Talajt szennyező cypermetrin hatása a *Tetrahymena* sejtszámára

Cypermetrin				
koncentráció	kontroll	5 ppm	250 ppm	500 ppm
meredekség	9,6429	7,3214	4,8929	2,6786
pusztulás (%)	0	24	49	72

A %-ban meghatározott pusztulásból veszem fel a cypermetrin koncentráció (talajban) összefüggését a pusztulás és az S-alakú görbéről olvasom le az EC₂₀ és EC₅₀ értékeket.



21. ábra Cypermetrin koncentráció *Tetrahymena*-ra gyakorolt pusztító hatás összefüggése

22. táblázat *Tetrahymena*-ra hatásos koncentrációértékek cypermetrin szennyezőanyag esetén

	Hatást mutató cypermetrin koncentráció (ppm)
EC ₂₀	4
EC ₅₀	263

23. táblázat Toxicitási adatok összehasonlítása cypermetrinre

	Számított érték	MPC érték*	B érték** (össz. növényvédő szerre)
EC ₅₀	263 ppm	39 ppm	0,01 ppm

* Crommentuijn, 2000 ** 10/2000 Kormány rendelet

4.1.7 Összefoglaló értékelés a *Tetrahymena* tesztorganizmusról

A *Tetrahymena* közel azonos érzékenységet mutat a talaj szennyezőanyagaira, a Diesel olaj szennyezőanyag esetében kevésbé bizonyult érzékenynek, mint fenantrén és cypermetrin esetén.

A pusztulás mind három esetben arányos volt mind az idővel, mind a talaj szennyezőanyag koncentrációjával. Fenntartása és tenyésztése egyszerű.

A tesztelés végpontja jelenleg az élő sejtszám, ennek mérése számlálókamrával történik, ami rendkívül időigényes és nagy gyakorlatot feltételez.

A tesztelt szennyezett talajoknál az is problémát jelenthet, hogy a szennyezőanyag bomlékonysága befolyásolja az eredményt, így a standardizálásnál különös gondot kell fordítani a mintavétel és a tesztelés között eltelt időre és a tárolási körülményekre.

Javaslatok

A *Tetrahymenát* más peszticidekkel és oldószerekkel szennyezett talajokra is célszerű lenne alkalmazni és kimérni az érzékenységet.

A sejtszám meghatározás időigénye és más nehézségei miatt át kéne térni egy objektíven, pontosabban és gyorsabban mérhető végpontra.

4.2 A szennyezett talaj kockázata felszín alatti vizekre

A talaj nem csak, mint élőhely, de mint a felszín alatti vizeket veszélyeztető szennyező forrás is kockázatot jelent.

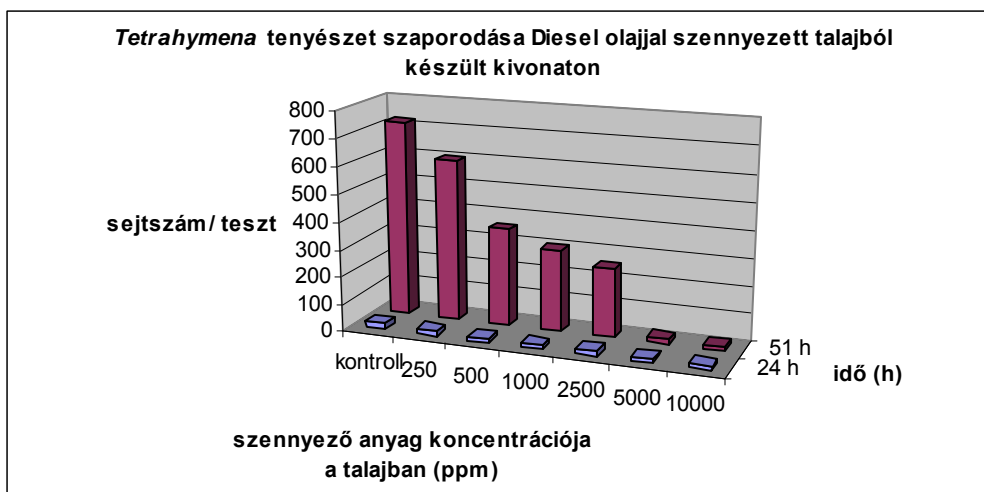
A szennyezett talaj felszín alatti vizekre vonatkozó kockázatát a talaj szilárd fáziséval egyensúlyt tartó talajvíz vagy az esővíz bemosó hatását reprezentáló csurgalék hatásának tesztelésével lehet mérni és jellemezni.

A talajból történő kimosódás modelljéül szolgál a talajból készült talajkivonat tesztelése. A talajkivonatot az MSZ21978-9 alapján készítettem, és *Tetrahymena* tesztorganizmussal teszteltem talajmentes rendszerben.

4.2.1 *Tetrahymena pyriformis* érzékenysége Diesel olajjal szennyezett talaj vizes

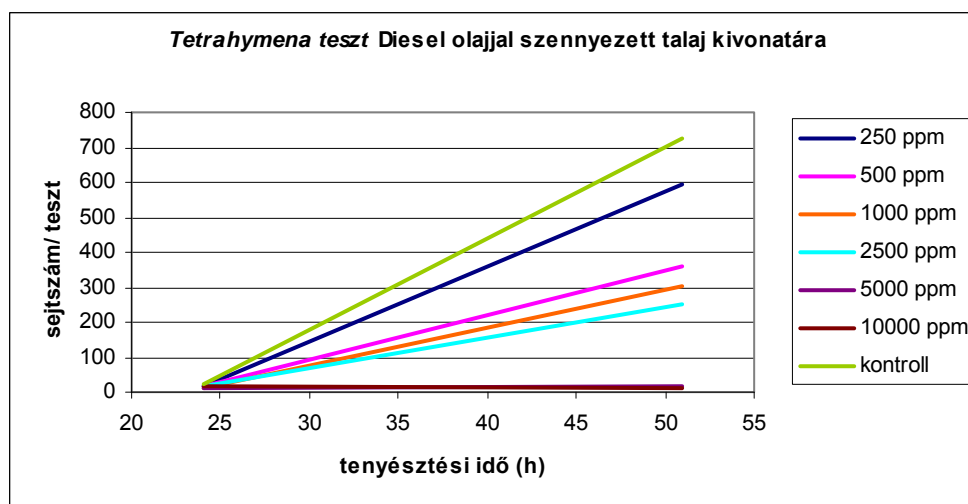
kivonatára

A különböző mértékben szennyezett talajokból a szabvány előírásai szerint vizes kivonatokot készítettem és ezeken a kivonatokon szaporította, a *Tetrahymenát*. A sejtszámot mikroszkópos sejtszámlálással követtem az időben.



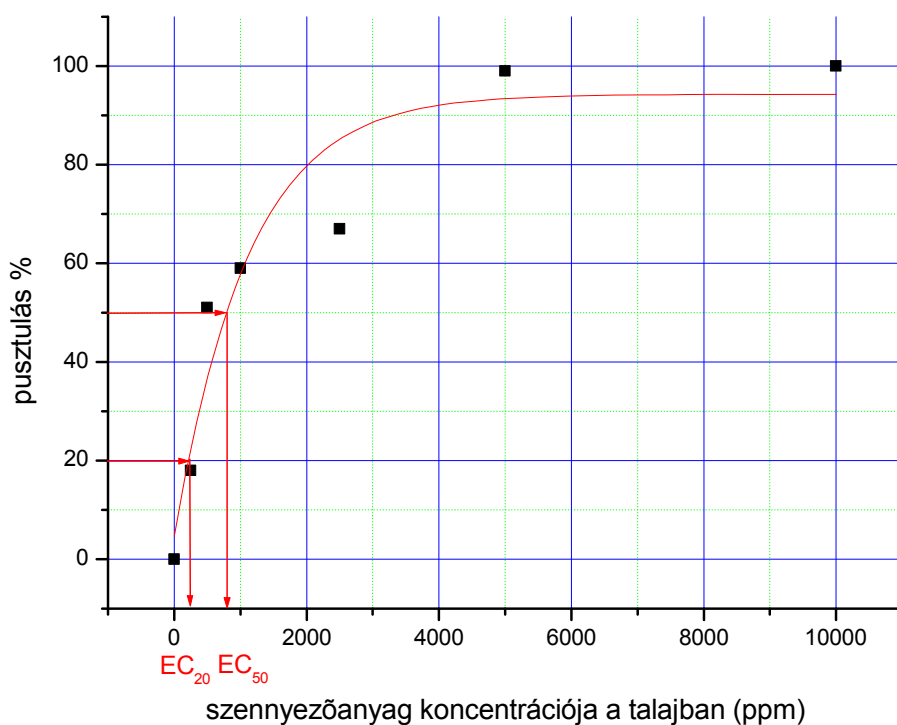
22. ábra *Tetrahymena* szaporodása Diesel olajjal szennyezett talajból készült vizes kivonaton

A tenyészet válasza arányos a koncentrációval, ha könnyen számolható lenne a sejtszám, ideális végpontot jelentene.



23. ábra *Tetrahymena* sejtszáma a Diesel olajjal szennyezett talaj kivonatának hatására

Az ábrán látható, hogy a *Tetrahymena* válasza arányos a talaj szennyezettségével és az idővel. Az egyenesek meredeksége és a pusztulási % alapján felvehetjük a koncentráció-válasz görbét. A koncentráció a talaj eredeti koncentrációját jelenti, a kivonatba átkerült Diesel olaj koncentrációt nem mértem kémiai analízissel.



24. ábra Koncentráció-hatás görbe kiértékelése Diesel olaj szennyezőanyag esetén vizes talajkivonatra

24. táblázat *Tetrahymena* pusztulása Diesel olajjal szennyezett talaj kivonatainak hatására

Diesel olaj							
koncentráció (ppm)	kontroll	250	500	1000	2500	5000	10000
meredekség	25,926	21,37	12,815	10,704	8,6667	0,1481	0,0741
pusztulási %	0	18	51	59	67	99	100

25. táblázat Hatásos koncentráció értékek Diesel olaj szennyezőanyag esetén

Hatást mutató Diesel olaj koncentráció (ppm)	
EC ₂₀	234
EC ₅₀	792

26. táblázat Becsült, mért és irodalmi toxicitási értékek összehasonlítása

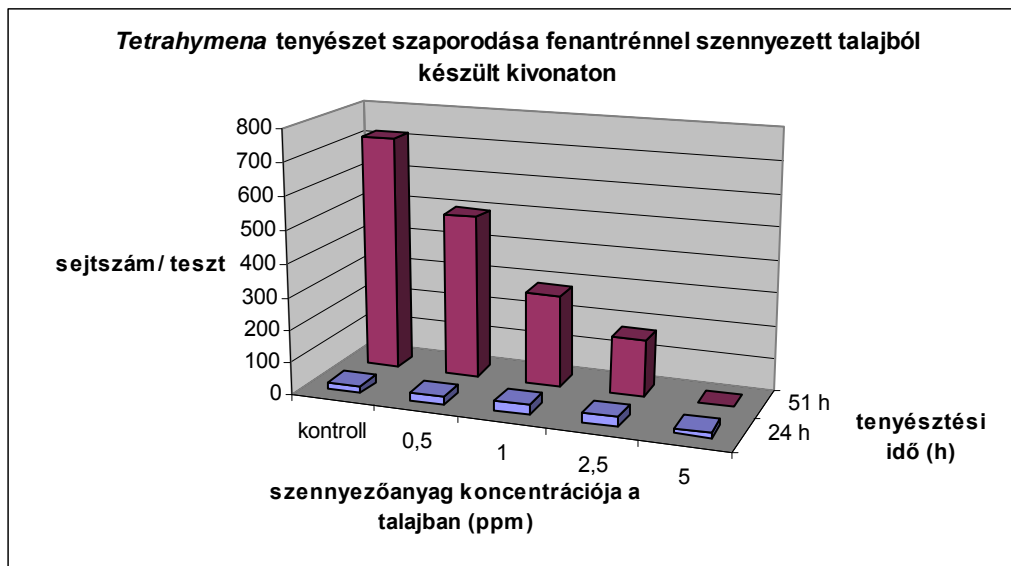
	Mért érték	Megoszlás alapján becsült érték	B érték (össz. TPH-ra)
	talajban	vízben	felszín alatti vízbe*
EC ₅₀	792 mg/kg	1584 µg/l	100 µg/l

*10/2000 Kormány rendelet,2000

A Diesel olajjal szennyezett talaj EC_{50} értéke egy nagyságrenddel eltér a szennyezettségi határértéktől, így megállapíthatjuk, hogy erre a szennyezőanyagra a *Tetrahymena*-nak kicsi az érzékenysége.

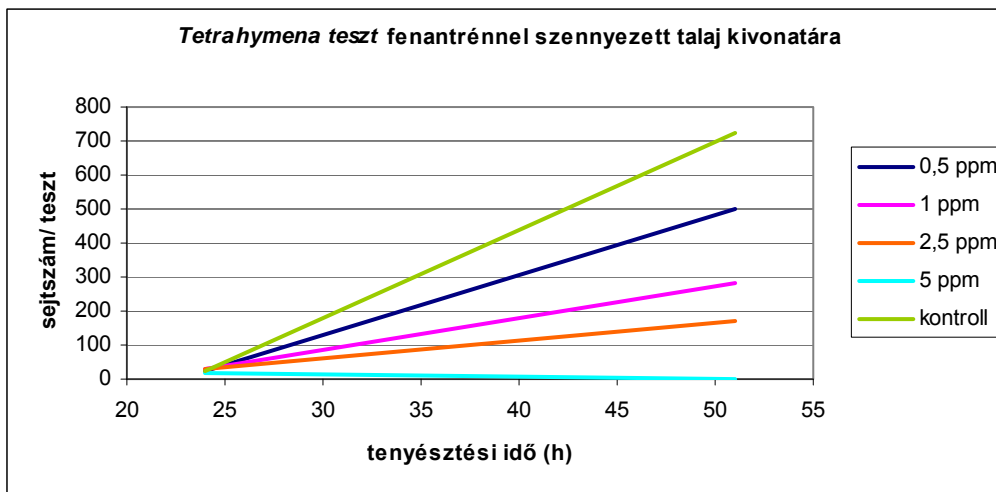
4.2.2 Tetrahymena pyriformis érzékenysége fenantrénnel szennyezett talaj vizes kivonatára

A talajt szennyező, talajhoz kötött fenantrénre is adott választ adott értékelhető a *Tetrahymena*, várható, hogy a vizes kivonatra is reagálni fog, bár a fenantrén nagy K_{ow} értéke miatt csak igen kis mértékben kerül át a talajjal érintkező vizes fázisba. Ugyanakkor a szennyezett talajokban számíthatunk természetes felületaktív anyagok, biotenzidek jelenlétére, amelyek mennyisége nagyban befolyásolhatja a fenantrén aktuális kockázatát.



25. ábra *Tetrahymena* tenyészet szaporodása fenantrénnel szennyezett talajból készült vizes kivonaton

A tenyészet válasza a Diesel olajéhoz hasonlóan szép arányosságot mutat a talajszennyezettséggel és az idővel, a sejtszámok szignifikáns különbségeket mutatnak.



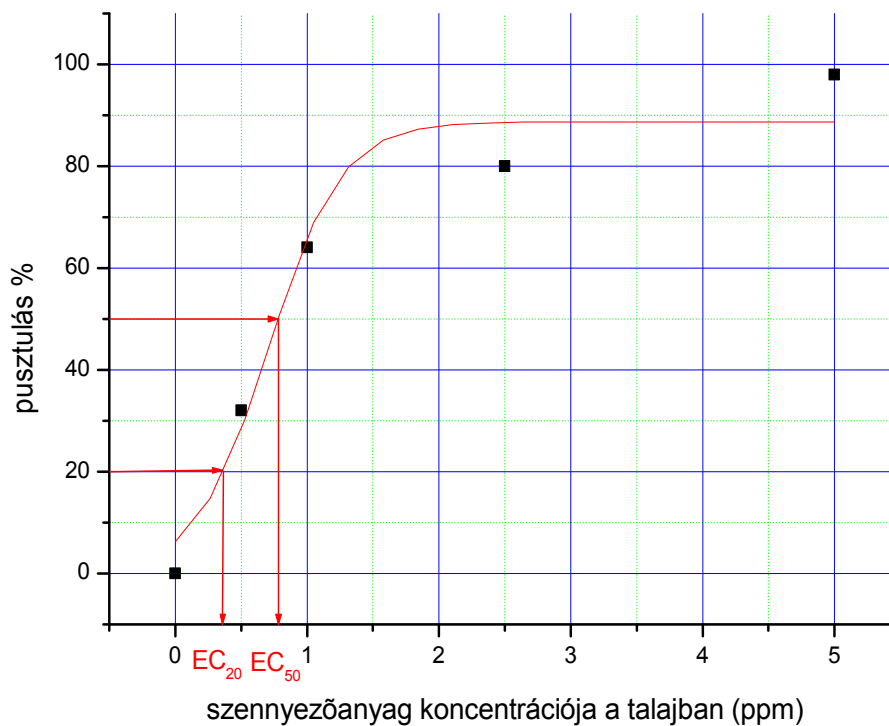
26. ábra *Tetrahymena* sejtszáma fenantrénnel szennyezett talajból nyert vizes kivonatok hatására

A sejtszámok arányosak a fenantrén koncentrációkkal és az idővel.

27. táblázat A tetrahymena pusztulása fenantrénnel szennyezett talajok kivonatainak hatására

Fenantrén					
koncentráció (ppm)	kontroll	0,5	1	2,5	5
meredekség	25,926	17,63	9,3704	5,2963	0,6296
pusztulás (%)	0	32	64	80	98

Az értékek ábrázolása és statisztikai értékelése nélkül is látható, hogy az EC_{20} 0,3–0,4 közötti érték, az EC_{50} pedig 0,75. Ez azt jelenti, hogy fenantrén esetén a víz jelenti a domináns kockázatot a *Tetrahymena* teszorganizmus számára. Ez azért fontos, mert a talaj másik jellemző lakói, a mikroorganizmusokra a fenantrén és a PAH-ok általában nem jelentenek káros hatást.



27. ábra Koncentráció-hatás görbe kiértékelése fenantrén szennyezőanyag esetén vizes talajkivonatra

Az Origin programmal kapott szabályos görbe lehetővé teszi az EC₂₀ és EC₅₀ értékek statisztikai értékelés utáni értékeinek leolvasását.

28. táblázat Fenantrénnel szennyezett talaj vizes kivonatának toxicitása *Tetrahymanára*

	Hatást mutató fenantrén koncentráció (ppm)
EC ₂₀	0,4
EC ₅₀	0,8

A mért EC₅₀ értékkel a szennyezőanyag megoszlása alapján megbecsülhetünk egy olyan toxicitási értéket, mely a talaj szennyezettségéből vonatkoztat az extraktumra a 4. egyenlet alapján.

4. egyenlet A megoszlás alapján becsülhető toxicitási érték számítása

$$C_{talajvíz} = \frac{C_{talaj}}{K_{oc} * f_{oc}}$$

ahol f_{oc} a vizsgált talaj szerves anyag tartalma (%) , mely minden mérésnél 0,05 a vizsgált fekete talaj adatainak megfelelően.

$$K_d = C_{talaj} / C_{talajvíz} = K_{oc} * f_{oc}$$

C_{talaj} a talajban mért koncentráció, jelen esetben az EC_{50} értéke (mg/kg)

$K_{oc} = a * K_{ow} + b$, QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) alapon fenantrénre a K_{oc} közelítő értéke azonos a K_{ow} -vel, ami az adott szennyezőanyag oktanol/víz megoszlási hányadosa.

29. táblázat Becsült, mért és irodalmi toxicitási értékek összehasonlítása

	Mért érték	Megoszlás alapján becsült érték	B érték (össz. PAH-ra)
	talajban	vízben	felszín alatti vízbe*
EC₅₀	0,8 mg/kg	0,43 µg/l	0,1 µg/l

*10/2000 Kormány rendelet,2000

A B értéket összehasonlítva az általam számított víz koncentráció értékkel látható, hogy mérés alapján fölé becsültem a talajvízben várható értéket az irodalmi értékhez képest, mely összes PAH-ra vonatkozik. Ezért javaslom a többi PAH-ra vonatkozó hatások kimérését is.

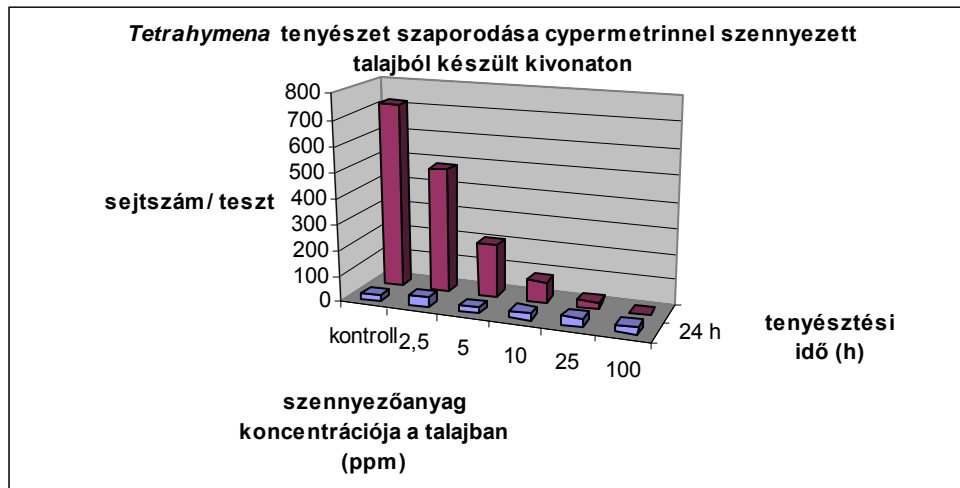
Ezt az érték összehasonlítva a háromfázisú talajra kapott eredménnyel arra a következtetésre juthatunk, hogy a 4 és 150 ppm-es értékhez képest egy, illetve két nagyságrenddel nagyobb érzékenységet értem el a *Tetrahymenával* a fenantrén vizes kivonatát tesztelve, mint a talajt.

Ez azt jelenti, hogy a háromfázisú talaj „pufferolja” a fenantrén toxicitását, feltehetően leköti, semlegesíti azokat az aktív helyeket, melyek a *Tetrahymena* receptorokhoz kötődéséhez szükségesek. Nagy valószínűséggel közrejátszik a szennyezett talajban mikrobiológiai közreműködéssel szintetizált biotenzidek hatása is a kioldódásra.

Ennek további vizsgálata és bizonyítása szükséges a jövőben.

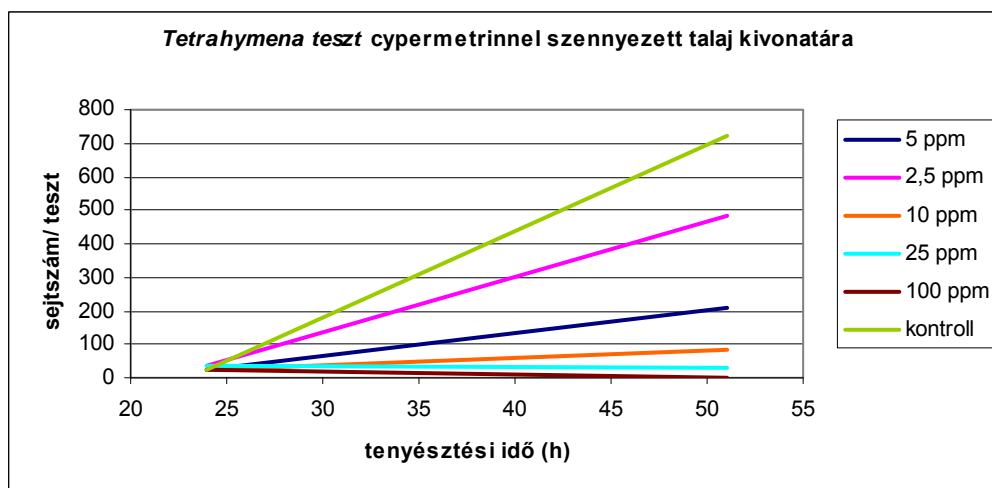
4.2.3 *Tetrahymena pyriformis* érzékenysége cypermetrinnel szennyezett talaj vizes kivonatára

Cypermetrin esetében is ugyanezt a koncepciót követtem: a szennyezett talajból készített kivonatot teszteltem és az eredményeket az eredeti talajkoncentrációkra adtam meg.



28. ábra *Tetrahymena* tenyésztés szaporodása cypermetrinnel szennyezett talajból készült vizes kivonaton

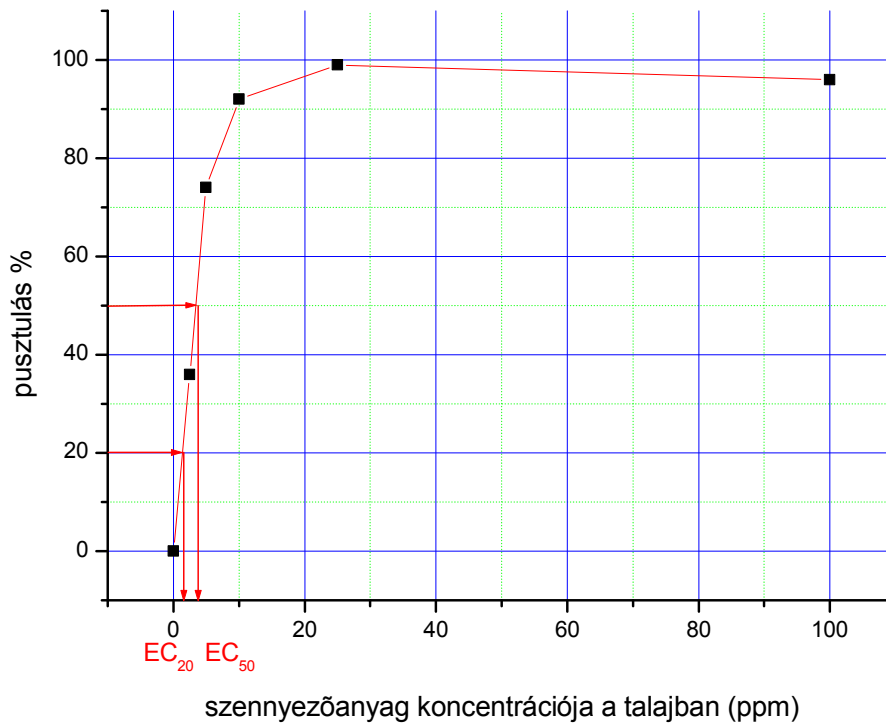
A számlálási eredmények arányosak, vizes kivonatban könnyebb is a tenyésztés és a számlálás, tehát célszerű a *Tetrahymenát* a szennyezett talaj által veszélyeztetett felszín alatti víz kockázatának jellemzésére használni.



29. ábra *Tetrahymena* sejtszáma cypermetrinnel szennyezett talaj kivonatának hatására

30. táblázat A sejtszám-idő egyenesek meredeksége és *Tetrahymena* pusztulása cypermetrinnel szennyezett talaj kivonatainak hatására

Cypermetrin						
koncentráció (ppm)	kontroll	2,5	5	10	25	100
meredekség	25,926	6,8148	16,481	2,037	0,2593	0,9259
pusztulási %	0	36	74	92	99	96



30. ábra *Tetrahymena* koncentráció-hatás görbéje cypermetrinnel szennyezett vizes kivonatait tesztelve

A *Tetrahymena* cypermetrinre is nagy érzékenységet mutat szennyezett talajból készült kivonat hatására. Mind az EC₂₀, mind az EC₅₀ érték 5 alatt van, összevetve ezt a háromfázisú talajban végzett vizsgálattal, amikor is ezek az értékek 4 és 250 ppm. Tehát itt is nagyságrendi különbségek mutatkoznak a vizes kivonat javára. Tehát megerősíthetjük, hogy a *Tetrahymena* nagyon jó tesztorganizmus a talajból talajvízbe történő transzportból adódó kockázat jellemzésére. Ez nem jelenti azt, hogy a talajt, mint élőhelyet nem jól jellemzi, lehetséges, hogy a talaj toxicitást pufferozó képessége ennyit jelent és a nagyságrenddel kisebb érzékenység nagyon is indokolt, hiszen a kockázat túlbecslése sem cél, mert az indokolatlan intézkedéseket és költségeket vonhat maga után.

31. táblázat Cypermetrin hatásos koncentrációja *Tetrahymenára* szennyezett talajból készült kivonatban

	<i>Tetrahymenára</i> Hatást mutató cypermetrin koncentráció (ppm)
EC ₂₀	1
EC ₅₀	4

32. táblázat Becsült, mért és irodalmi toxicitási adatok összehasonlítása

	Mért érték	Megoszlás alapján becsült érték	MPC érték (össz. növényvédő szerre)
	talajban	vízben	felszín alatti vízbe*
EC ₅₀	4 mg/kg	0,02 µg/l	0,0005 mg/l

* 10/2000 Kormány rendelet, 2000

A *Tetrahymenával* talajra mért szennyezőanyag EC₅₀ értékéből a talajjal egyensúlyt tartó vízre becsült érték és az irodalmi adat közel azonos nagyságrendbe esnek, így elmondható, hogy a *Tetrahymena* cypermetrinre érzékeny tesztorganizmus, mely fölébecsüli az ökoszisztéma egészére jellemző kockázatot, de ilyenformán eleget tesz a konzervatív szemléletnek.

4.2.4 *Tetrahymena* alkalmassága szennyezett talajok vizes kivonatának vizsgálatára

Tetrahymena érzékenységről szennyezett talajból készült kivonaton végzett vizsgálataim alapján elmondható, hogy a lényegesen nagyobb, mint a háromfázisú talajban, tehát a felszín alatti víz azon kockázatának megítélésére, mely a talaj szennyezettségéből ered, nagyon megfelelő organizmus lehet. Egy-két nagyságrenddel nagyobb érzékenységet mutatott mind a három vizsgált szennyezőanyag esetében.

A *Tetrahymena* példája is jól mutatja, hogy a talaj milyen összetett rendszer, hogy ugyanaz a szennyezőanyag mutathat kisebb, de mutathat nagyobb toxikus hatást is a háromfázisú talajban a vizes kivonathoz képest.

Egyes tesztorganizmusok maguk is közreműködnek a szennyezőanyagok hozzáférhetővé tételében, ilyenkor a kölcsönhatás, a direkt érintkezés megnöveli a mérhető hatást a háromfázisú talajban a vizes kivonathoz képest.

Más esetekben viszont, pontosan az ellenkezője igaz, ilyen a fenantrén és a cypermetrin esete a *Tetrahymenával*, amikor valószínűsíthetjük, hogy a *Tetrahymenát* károsító hatásért felelős aktív helyek a molekulákon ugyanazok, mint a talajhoz kötődésért felelős helyek, emiatt a talajban kötött, erősen adszorbeálódott szerves molekulák, még a tesztorganizmus esetleges feltáró hatására sem mutatnak jelentős káros hatást.

Megfigyelés

Vizsgálataim során megfigyeltem, hogy 68-75 óra elteltével a *Tetrahymena* tenyészet morfológiai elváltozást szenved, mely nem járt sejtszám változással, de mértéke arányos volt a szennyező anyag koncentrációjával. Diesel olajjal folytatott kísérleteimnél 70 óra elteltével a sejtek rohamosan összezsugorodtak, mely megnehezítette a számlálást. Fenantrén és cypermetrin szennyezőanyagok esetén a sejtek összezsugorodtak, megváltoztatták alakjukat és tenyészetük morfológiáját. Mind három esetben a szennyezőanyag koncentrációjának növekedésével megfigyelhető volt, hogy az élő sejtek megpróbálták maguk köré gyűjteni a lebegő talajszemcséket, mintegy izolálni magukat az oldatban lévő szennyezőanyagtól. Megfigyeléseim is azt támasztják alá, hogy esetleg lehet a pusztulástól eltérő, új, érzékenyebb végpontot keresni a teszthez. Az érzékenyebb végpont egyben a teszt időigényének csökkenését is eredményezheti.

Javaslat

Tetrahymena válaszána screenelése azokra a talajszennyező vegyi anyagokra, amelyek potenciális veszélyeztetői a felszín alatti vizeknek; más peszticidek, PAH-ok, klórozott és nem klórozott oldószerek, kőolajszármazékok, stb.

4.3 Szennyezett talajból eredő felszíni víz szennyezettség jellemzése bioteszttel

Méréseim célja, hogy kiderítsem, hogy az általam szennyezett talajok, hogyan hatnának a vízi ökoszisztémára, ha oda talajvízzel, erózióval, vagy esővízzel bemosódnának. Azért esett a választásom a *Daphnia magna* tesztorganizmusra, mert egyrészt igen elterjedt a hazai vizekben, másrészt a szennyezésekkel szemben érzékeny. További indok a választásomra, hogy ismert és szabványosított teszt létezik ezzel a tesztorganizmussal: MSZ EN ISO 6341:1998.

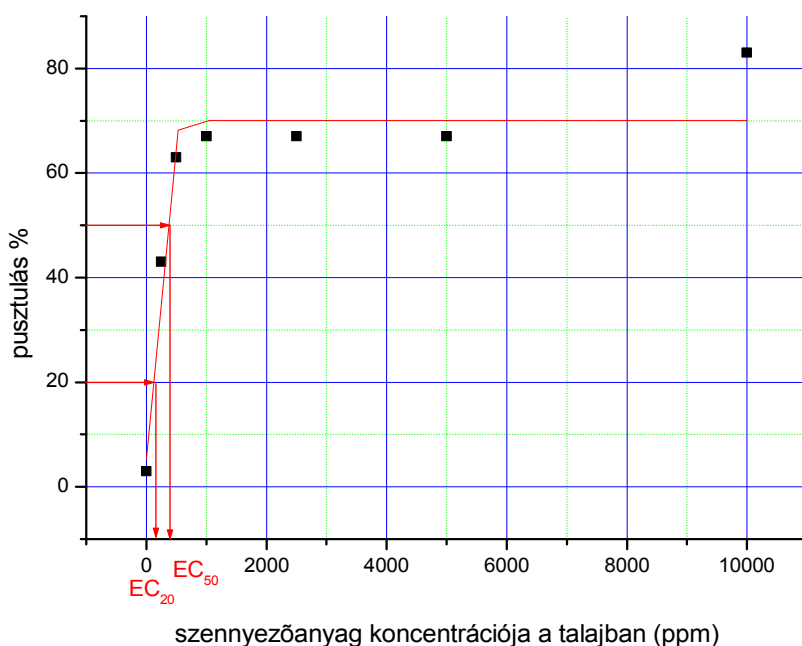
4.3.1 *Daphnia* érzékenysége Diesel olajjal szennyezett talaj vizes kivonatára

A kísérlet koncepciója, mely meghatározta a metodikát a következő: a mesterségesen szennyezett talajból vizes kivonatokat készítettem, majd ezeket a kivonatokat teszteltem a *Daphniával*. Az eredményeket a talaj eredeti koncentrációjának függvényében adtam meg és értékeltem. A mérési eredményeket a 33. táblázat tartalmazza.

33. táblázat *Daphnia* pusztulása Diesel olajjal szennyezett talaj kivonatának hatására

szennyezőanyag koncentrációja a talajban	szennyezőanyag koncentrációja a kivonatban	teszt egyedek száma	pusztulás 24 h elteltével		pusztulás 48 h elteltével		kiegészítő mérések	
			egyed	%	egyed	%	oldott O ₂ (mg/l)	pH
ppm	mg/l	db	egyed	%	egyed	%	oldott O ₂ (mg/l)	pH
0	0	30	0	0	1	3	6,3	7,36
250	25	30	11	37	13	43	6,32	7,43
500	50	30	11	37	19	63	6,29	7,37
1000	100	30	13	43	20	67	6,34	7,41
2500	250	30	14	47	20	67	6,33	7,38
5000	500	30	13	43	20	67	6,36	7,35
10000	1000	30	19	63	25	83	6,09	7,24

A számlálással nyert értékek jó egyezést és a várttal egyező trendeket mutatnak. A 250 ppm alatti tartományt érdemes lenne részletesen is újra kimérni.



31. ábra *Daphnia* pusztulása Diesel olaj szennyezett talaj vizes kivonatában

A 31. ábra a 48 órás mérési eredményeket mutatja. A kapott eredményeket Microcal Origin 6.0 programmal ábrázolva és a mérési pontokra szigmoid görbét illesztve meghatározhatóvá vált EC_{20} és EC_{50} értéke, melyeket a 34. táblázatban foglaltam össze.

34. táblázat Hatásos koncentráció értékek Diesel olaj szennyezőanyag esetén

<i>Daphnia magnára</i> Hatást mutató Diesel olaj koncentráció (ppm)	
EC_{20}	144
EC_{50}	378

35. táblázat Becsült, mért és irodalmi toxicitási értékek összehasonlítása

	Mért érték	Megoszlás alapján becsült érték**	B érték (össz. TPH)
	talajban	vízben	felszíni vízre*
EC_{50}	378 mg/kg	75,6 µg/l	100 µg/l

*10/2000 Kormány rendelet, 2000

**A talaj f_{oc} értéke 0,05 és a pesszimizmus jegyében $K_{ow} = 10^5$ értékkel számoltunk a Diesel olajnál.

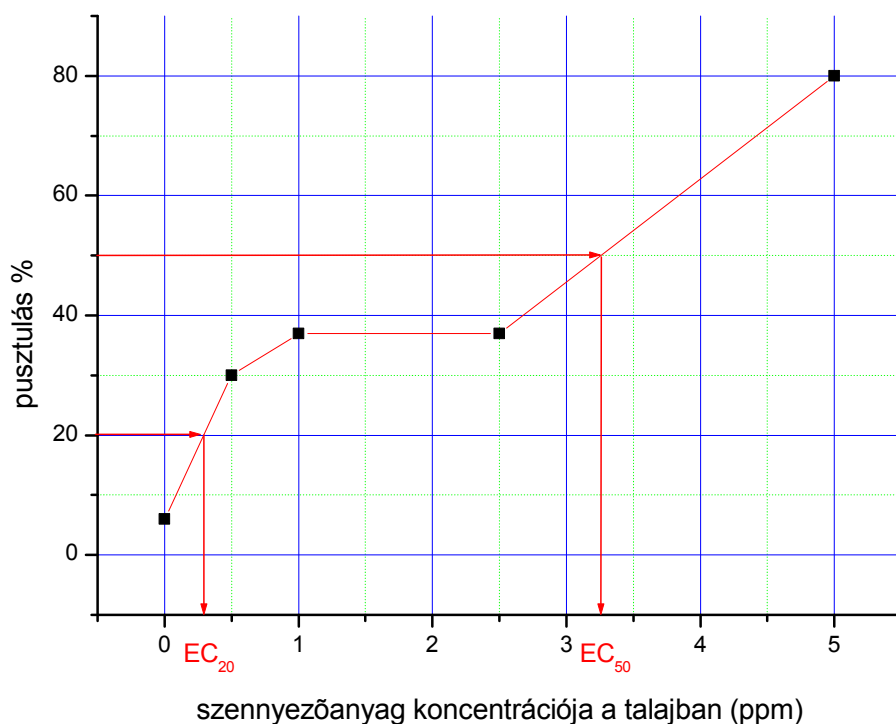
A mért értékek a szennyezettségi határértékkel azonos tartományba esnek, tehát a *Daphniával* várhatóan jól jellemezhető a szennyezett talaj felszíni vízre gyakorolt hatása és ebből a Diesel olaj kockázata.

4.3.2 *Daphnia* érzékenysége fenantrénnel szennyezett talaj vizes kivonatára

A fenantrén kevésbé vízoldható, mint a Diesel olaj, ezért vizes kivonatba kerülésének és a *Daphniára* kifejtett hatásának előrejelzése szinte lehetetlen. A mérési eredményeket a 36. táblázat tartalmazza.

36. táblázat *Daphnia* pusztulása fenantrénnel szennyezett talaj kivonatának hatására

Szennyezőanyag koncentrációja a talajban	Szennyezőanyag koncentrációja a kivonatban	Teszt egyedek száma	<i>Daphnia</i> pusztulása 24 h elteltével		<i>Daphnia</i> pusztulása 48 h elteltével		Kiegészítő mérések	
			egyed	%	egyed	%	oldott O ₂ (mg/l)	pH
ppm	mg/l	db	egyed	%	egyed	%	oldott O ₂ (mg/l)	pH
0	0	30	0	0	2	6	6,31	7,62
0,5	0,05	30	8	27	9	30	6,23	7,53
1	0,1	30	9	30	11	37	6,25	7,51
2,5	0,25	30	8	27	11	37	6,4	7,65
5	0,5	30	21	70	24	80	6,37	7,64



32. ábra Koncentráció-hatás görbe kiértékelése 48 órás mérés és fenantrén szennyezőanyag esetén vizes talajkivonatra

37. táblázat *Daphniára* gyakorol hatás értékelése fenantrénnel szennyezett talaj kivonatában

	Hatást mutató fenantrén koncentráció (ppm)
EC ₂₀	0,3
EC ₅₀	3,3

38. táblázat Becsült, mért és irodalmi toxicitási adatok összehasonlítása

	Mért érték	Megoszlás alapján becsült érték**	MPC érték
	talajban	vízben	felszíni vízbe*
EC ₅₀	3,3 mg/kg	1,8 µg/l	30 µg/l

*Crommentuijn,2000

**A talaj f_{oc} értéke 0,05 és a pesszimizmus jegyében $K_{ow} = 10^{4,57}$ értékkel számoltunk a fenantrénnél

A becsült érték egy nagyságrenddel is kisebb, mint az irodalmi adat, tehát a *Daphnia* tesztorganizmus fölébecsüli a fenantrén kockázatát az átlagos ökoszisztémához képest.

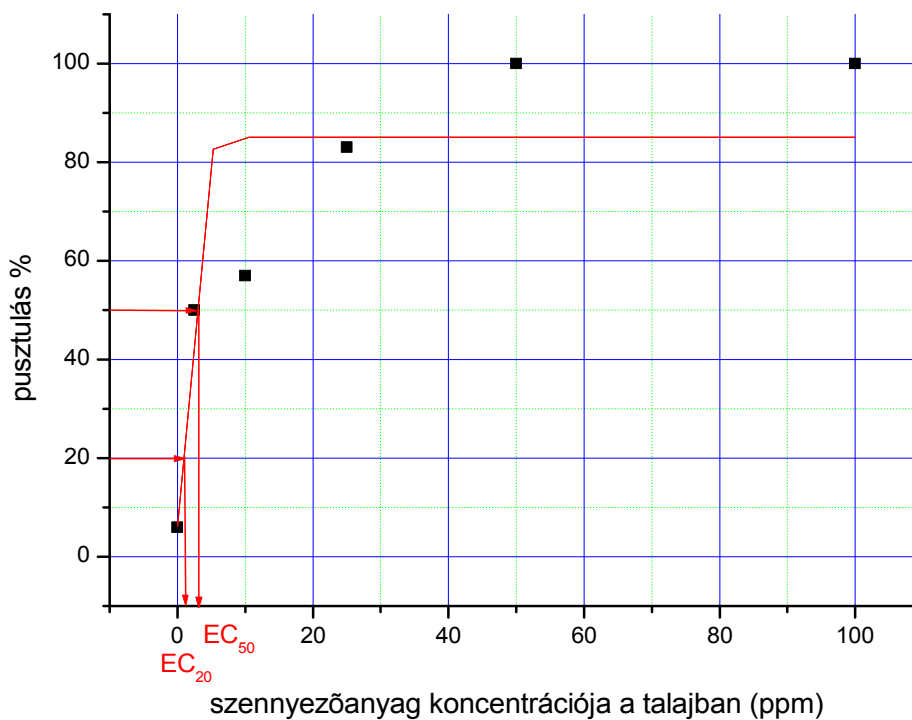
4.3.3 Daphnia érzékenysége cypermetrinnel szennyezett talaj vizes kivonatára

Cypermetrin rovarirtószer, felszíni vízbe kerülése direkt módon és a talajból az egyik legjellemzőbb transzportútvonon. A mérési eredményeket a 49. táblázat tartalmazza.

39. táblázat *Daphnia* pusztulása cypermetrinnel szennyezett talaj kivonatának hatására

Szennyezőanyag koncentrációja a talajban	Szennyezőanyag számított koncentrációja a kivonatban	Teszt egyedek száma	<i>Daphnia</i> pusztulása 24 h elteltével		<i>Daphnia</i> pusztulása 48 h elteltével		Kiegészítő mérések	
			egyed	%	egyed	%	oldott O ₂ (mg/l)	pH
ppm	mg/l	db	egyed	%	egyed	%	oldott O ₂ (mg/l)	pH
0	0	30	0	0	2	6	6,31	7,62
2,5	0,25	30	10	33	15	50	6,2	7,6
10	1,0	30	9	30	17	57	6,43	7,37
25	2,5	30	20	67	25	83	6,33	7,4
50	5	30	24	80	30	100	6,15	7,44
100	10	30	29	97	30	100	6,1	7,5

Arányosak a mért értékek, szabályos a görbe, az EC₂₀ és EC₅₀ a 2,5 ppm talajszennyezettség alá fog esni.



33. ábra *Daphnia* pusztulása cypermetrinnel szennyezett talaj vizes kivonatának hatására

A 48 órás adatokat láthatjuk a koncentráció-hatás diagramon. Az S-alakú görbéről leolvasott értékek a 40. táblázatban találhatóak.

40. táblázat Cypermetrinnel szennyezett talaj kivonatának toxicitása *Daphnia magna*

	<i>Daphniára</i> hatást mutató cypermetrin koncentráció (ppm)
EC ₂₀	1
EC ₅₀	2,5

41. táblázat Becsült, mért és irodalmi toxicitási adatok összehasonlítása

	Mért érték	Megoszlás alapján becsült érték**	MPC érték
	talajban	vízben	felszíni vízbe*
EC ₅₀	2,5 mg/kg	0,0125 µg/l	0,009 µg/l

*Crommentuijn, 2000

**A talaj foc értéke 0,05 és a pesszimizmus jegyében $Kow = 106,6$ értékkel számoltunk a cypermetrinnél

A becsült és irodalmi értékek egyforma tartományba esnek, sőt majdnem azonosak, így a *Daphniával* végzett talajkivonatos tesztek cypermetrinre igen érzékenynek bizonyultak.

4.3.4 *Daphnia* felhasználása szennyezett talaj kockázatának értékelésére

A *Daphnia* összehasonlítva a háromfázisú talajra alkalmazott két szárazföldi tesztorganizmussal (*Tetrahymena* és *Collembola*) érzékenységet mutatott. A szennyezett talajból készült kivonaton végzett vizsgálataim alapján elmondható, hogy a felszíni vízre vonatkozó kockázat megítélése többletinformációt ad a talajjal végzett vizsgálatokhoz képest. Ugyanakkor a kivonat készítése és a teszt bonyolultsága indokoltá teszi hasonló vagy még érzékenyebb választ produkáló vízi élőlények kipróbálását és érzékenységük tesztelését. Mivel ez a scenárió elég hasonló a felszín alatti vizekéhez, összehasonlító vizsgálatok alapján értékelni kéne a *Tetrahymena* ilyen célra történő alkalmazását is.

Javaslat

Daphniával azonos választ produkáló vagy annál érzékenyebben reagáló vízi ökoszisztéma tagok kipróbálása talajkivonatok tesztelésére.

Mivel a *Daphnia* az egyik legelterjedtebb és legismertebb vízi tesztorganizmus és a teszt is kikristályosodott az évek során, tesztjének módosítása nem egyszerű feladat, mindazonáltal szükséges lenne az időigény és munkaigény csökkentése. Ezt a tesztorganizmus cseréjével vagy a végpont megváltoztatásával lehetne elérni. Erre vonatkozóan kísérleteket nem végeztem.

4.4 Összefoglaló értékelés a tesztekéről és a tesztorganizmusokról

A következőkben táblázatos formában hasonlítom össze az általam használt tesztorganizmusokat a szennyezőanyag típusa, a scenáriók, illetve az EC₂₀ és EC₅₀ értékek alapján.

4.4.1 A scenáriók összehasonlítása

4.4.1.1 A talaj, mint élőhely

A talaj, mint élőhely jellemzésére szárazföldi ökoszisztéma tagokat választottam tesztorganizmusban. Ezek EC₂₀ és EC₅₀ eredményeit mutatja a 42. táblázat.

42. táblázat Talajszennyező anyagok toxicitás-értékei *Collembola* és *Tetrahymena* tesztorganizmusokkal

A talajra vonatkozó kockázat				
szennyezőanyag	<i>Collembola</i> teszt talajra		<i>Tetrahymena</i> teszt talajra	
	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
Diesel olaj	500 ppm	1 800 ppm	9 576 ppm	13 780 ppm
fenantrén	145 ppm	200 ppm	3 ppm	150 ppm
cypermetrin	1 ppm	3 ppm	4 ppm	263 ppm

43. táblázat Irodalmi határértékek talajra

szennyezőanyag	MPC érték*	B érték**
Diesel olaj	-	100 mg/kg
fenantrén	50 mg/kg	1 mg/kg
cypermetrin	39 mg/kg	-

*Crommentuijn,2000 **10/2000 Kormány rendelet, 2000

4.4.1.2 A szennyezett talaj, mint a felszín alatti víz veszélyeztetője

Ezt a scenáriót a vizes kivonatok tesztelésével és a teszteredmények az eredeti talaj koncentrációértékeihez viszonyítva értékeltem. Ezzel a módszerrel a talaj, mint élőhely eredményeivel is össze tudom vetni az eredményeket. A vizes kivonatot olyan élőlényel, a *Tetrahymenával* teszteltem, mely a talaj pórúsvízben, tehát a vizes fázisban él.

44. táblázat Felszín alatti vizet szennyező szerves anyagok toxicitása *Tetrahymenával* mérve

A felszíni alatti vízre vonatkozó kockázat		
szennyezőanyag	<i>Tetrahymena</i> teszt talajkivonatra	
	EC ₂₀	EC ₅₀
Diesel olaj	234 ppm	792 ppm
fenantrén	0,4 ppm	0,8 ppm
cypermetrin	1 ppm	4 ppm

45. táblázat *Tetrahymena* tesztek összehasonlítása tesztközeg alapján

Tetrahymena tesztek összehasonlítása				
	<i>Tetrahymena</i> teszt talajkivonatra		<i>Tetrahymena</i> teszt talajra	
szennyezőanyag	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
Diesel olaj	234 ppm	792 ppm	958 ppm	1354 ppm
fenantrén	0,4 ppm	0,8 ppm	3 ppm	150 ppm
cypermetrin	1 ppm	4 ppm	4 ppm	263 ppm

46. táblázat Irodalmi határértékek felszín alatti vízre

szennyezőanyag	B érték*
Diesel olaj (össz. THP-ra)	100 µg/l
fenantrén (össz. PAH-ra)	0,1 µg/l
cypermetrin (össz. növényvédő szerre)	0,5 µg/l

*10/2000 Kormány rendelet, 2000

4.4.1.3 A felszíni víz szennyeződésért felelős talaj tesztelése

A felszíni víz szennyeződésért felelő talaj tesztelésére a *Daphnia magna* víziélőlényt alkalmaztam és ennek eredményeit hasonlítottam a szárazföldi és felszín alatti vízi élőlények válaszához, valamint a határértékekhez.

47. táblázat Felszíni vizet szennyező szerves anyagok toxicitása *Daphniával* tesztelve

A felszíni vízre vonatkozó kockázat		
	<i>Daphnia</i> teszt talajkivonatra	
szennyezőanyag	EC ₂₀	EC ₅₀
Diesel olaj	144 ppm	378 ppm
fenantrén	0,3 ppm	3 ppm
cypermetrin	1 ppm	2,5 ppm

48. táblázat Ökotoxikológiai tesztek eredményeinek összehasonlítása

Ökotoxikológiai tesztek összehasonlítása								
szennyezőanyag	Collembola teszt talajra		Tetrahymena teszt talajkivonatra		Tetrahymena teszt talajra		Daphnia teszt talajkivonatra	
	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
Diesel olaj	500 ppm	1800 ppm	234 ppm	792 ppm	9576 ppm	13780 ppm	144 ppm	378 ppm
fenantrén	145 ppm	200 ppm	0,4 ppm	0,8 ppm	3 ppm	150 ppm	0,3 ppm	3 ppm
cypermetrin	1 ppm	3 ppm	1 ppm	4 ppm	4 ppm	263 ppm	1 ppm	2,5 ppm

49. táblázat Irodalmi határértékek felszíni vizekre

szennyezőanyag	MPC érték*
Diesel olaj	-
fenantrén	30 µg/l
cypermetrin	0,009 µg/l

*Crommentuijn,2000

4.4.2 Az általam tesztelt szennyezőanyagokra vonatkozó érzékenység összehasonlító vizsgálata

4.4.2.1 Diesel olaj

50. Táblázat Mért és irodalmi határértékek összehasonlítása Diesel olajra tesztközegek szerint

Tesztorganizmus	Tesztközeg	saját EC ₅₀ értékek	Magyar B értékek (TPH)***
Collembola	talaj	1800 ppm	100 ppm
	talaj	13780 ppm	100 ppm
Tetrahymena	talajkivonat	T*: 792 mg/l	100 µg/l
		TK**: 1584 µg/l	
Daphnia	talajkivonat	T*: 378 mg/l	100 µg/l
		TK**: 756 µg/l	

*A talajra vonatkozó ** Az extraktumban becsült ***10/2000 Kormány rendelet,2000

51. táblázat Holland és magyar határértékek Diesel olaj szennyezőanyagra

	Szennyezettségi határérték B/MPC	Hatáson alapuló cél érték talajra	Hatáson alapuló cél érték felszíni vízre	Intézkedési határérték talajra	Intézkedési határérték felszíni vízre
holland*	-	50 ppm	50 µg/l	5000 ppm	600 µg/l
magyar**	Talaj:100 ppm Felszíni víz: 100µg/l	-	-	300-5000 ppm	500-2000 µg/l

*Swartjes, 1999 **10/2000 Kormány rendelet,2000

4.4.3.2 Fenantrén

52. Táblázat Mért és irodalmi határértékek összehasonlítása fenantrénre tesztközegek szerint

Tesztorganizmus	Tesztközeg	Saját EC ₅₀ értékek	MPC értékek ***
<i>Collembola</i>	talaj	200 ppm	50 ppm
<i>Tetrahymena</i>	talaj	187 ppm	50 ppm
	talajkivonat	T*: 0,8 mg/l TK**: 0,43 µg/l	0,0001 mg/l
<i>Daphnia</i>	talajkivonat	T*: 3,3 mg/l	0,03 mg/l
		TK**: 1,8 µg/l	

*A talajra vonatkozó ** Az extraktumban becsült ***Crommentuijn, 2000

53. táblázat Amerikai határérték fenantrén szennyezőanyagra*

Tesztorganizmus	Toxicitási érték (TL _m)
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	0,6 ppm

*Verschueren, 1983

54. táblázat Holland és magyar határértékek fenantrén szennyezőanyagra

	Szennyezettségi határérték B/MPC*	Hatáson alapuló cél érték talajra**	Hatáson alapuló cél érték felszíni vízre*	Intézkedési határérték talajra	Intézkedési határérték felszíni vízre*
holland	20 µg/kg*d	50 ppm	0,003 µg/l	-	5 µg/l
magyar***	Talaj: 1 ppm Felszíni víz: 0,1 µg/l	-	-	5-40 ppm	0,1-5 µg/l

* Swartjes, 1999 ** Crommentuijn, 2000 ***10/2000 Kormány rendelet összes PAH-ra, 2000

4.4.3.3 Cypermetrin

55. Táblázat Mért és irodalmi határértékek összehasonlítása cypermetrinre tesztközegek szerint

Tesztorganizmus	Tesztközeg	saját EC ₅₀ értékek	MPC értékek***
<i>Collembola</i>	talaj	0,3 ppm	39 ppm
<i>Tetrahymena</i>	talaj	254 ppm	39 ppm
	talajkivonat	T*: 4,0 mg/l TK**: 0,02 µg/l	0,0005 mg/l
<i>Daphnia</i>	talajkivonat	T*: 2,5 mg/l	0,00009 mg/l
		TK**: 0,0125 µg/l	

*A talajra vonatkozó ** Az extraktumban becsült ***Crommentuijn, 2000

56. táblázat Magyar határértékek cypermetrin szennyezőanyagra*

Tesztorganizmus	Toxicitási értékek (TL _m)
Méh (24 h)	0,00002 mg/méh

Ponty (96 h)	0,028 mg/l
--------------	------------

* *Cypermethrin A, 1989*

57. Táblázat Holland és magyar határértékek cypermetrin szennyezőanyagra

	Szennyezettségi határérték B/MPC*	Hatáson alapuló cél érték talajra**	Hatáson alapuló cél érték felszíni vízre**	Intézkedési határérték talajra***	Intézkedési határérték felszíni vízre***
holland	-	39 ppm	0,00009 mg/l	2,5 ppm	0,7 µg/l
magyar*	Talaj: 0,01 ppm Felszíni víz: 0,5 µg/l	-	-	0,02-2 ppm	0,1-5 µg/l

*10/2000 Kormány rendelet összes növényvédő szerre, 2000 ** Crommentuijn, 2000 *** Swartjes, 1999

5. Összefoglalás

A kockázatközpontú környezetmenedzsment új típusú mérési módszereket követel, olyanokat, melyek segítségével a vegyi anyagok aktuális hatását és a hatáson alapuló kockázatát tudjuk jellemezni. Mind az általános kockázat, mind a helyszínspecifikus kockázat felmérés integrált metodikát igényel, olyat, melyben a kémiai analízist biológiai teszteredményekkel kiegészítve értékelhetjük a kockázatos anyagok potenciális káros hatásait. A vegyi anyagok általános kockázatával összefüggő egyik menedzsment probléma a hatáson alapuló határértékek képzése. Az ökológiai háttérérték képzéshez három trófikus szintről származó tesztorganizmussal mért eredmény szükséges. A legnagyobb hiány az állati tesztorganizmusokban és a velük kidolgozott módszerekben van.

A helyszínspecifikus ökológiai kockázat esetében a szennyezett környezeti elemek aktuális kockázatából kell kiindulnunk és a környezetet szennyező konkrét anyagok környezeti kockázatának terület specifikus jellegét a kifejtett hatások ismeretében megállapítani. Ehhez szintén hiányzik az állati trófikus szint.

Főként a talajra alkalmazható módszerek fejlesztésére lenne szükség, hiszen a talaj nemcsak egy igen komplex környezeti elem, hanem egy három fázisú élőhely is, így a talajra vonatkozó ökotoxikológiai teszteknek akkor lenne igazán értelme, ha minden lehetséges szennyezési útvonalat és szennyező forrást figyelembe vennének a kockázat nagyságának becslésekor. Ehhez járul még a szennyezőanyagok mobilitás változásából, fázisok közötti megoszlásából és degradációjából adódó, kémiai analízissel követhetetlen változások, melyek szintén az aktuális hatások mérésével hidalhatók át.

Fejlesztéseink során olyan állati tesztek fejlesztése volt a célunk, melyek lehetőleg egysejtű vagy egyszerű szervezetű állatokat (mikroszervezeteket) alkalmaz, könnyen és rövid idő alatt kivitelezhető, és eleget tesz a biotesztekkel szemben általában fennálló követelményeknek.

A fejlesztendő tesztek kiválasztása és alkalmazása három környezeti scenárió modellezésén alapul. A modellek minden esetben a talaj szennyezettségét állították a középpontba, ennek megfelelően az alábbi scenáriók kockázatának vizsgálatához alkalmas tesztek fejlesztettünk:

A talaj, mint élőhely jellemzésére a *Tetrahymena* és *Collembola* tesztorganizmusokat választottuk, melyek a talajjal való közvetlen érintkezésükből kifolyólag jól reprezentálják a talaj szennyezettségéből adódó kockázatot.

A talaj, mint a talajvizet veszélyeztető szennyeződés forrása és visszatartója: ez a scenárió a talaj-talajvíz kölcsönhatásból, a szennyezőanyag megoszlásából és a vizes talajfázisba kerüléséből adódik. A kockázat jellemzésére a *Tetrahymena pyriformis* egysejtű mikroorganizmust alkalmaztuk szennyezett talajból készült talajkivonaton

A talajt, mint felszíni vizet szennyező elem: a talajból erózióval, esővel vagy talajvízzel a felszíni vízbe mosódó szennyezőanyag hatását a *Daphnia magna*, vizibolhával mértük, melyre létezik szabványosított módszer, így összehasonlíthatóvá vált az is, hogy ez hogyan viszonyul a többi, általunk kifejlesztett és alkalmazott új módszerhez.

Három tipikus szerves szennyezőanyagra végeztük a tesztelést: Diesel olajra, mely egy jól ismert hatású szennyezőanyag; fenantrenre, mely policiklikus aromás szénhidrogén és cypermetrinre, mely egy kiterjedten alkalmazott peszticid.

Az 58. és 59. táblázatban összefoglaltuk az általunk alkalmazott tesztek legfőbb jellemzőit.

58. táblázat Diplomamunkámban alkalmazott tesztek metodikájának összehasonlítása

Tesztorganizmus	<i>Folsomia candida</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>Daphnia magna</i>
A teszt típusa	egy fajt alkalmazó	egy fajt alkalmazó	egy fajt alkalmazó
	laboratóriumi	laboratóriumi	laboratóriumi
	állati	állati	állati
	akut toxicitási	akut toxicitási	akut toxicitási
Alkalmazása	a teljes talajra közvetlenül	teljes talajra és talajkivonatra	talajkivonatra
Végpont	letalitás	reprodukció gátlás	letalitás
Tesztelés időtartama	7 nap	50-52 óra	48 óra
Teszt költsége	Kis költség	Közepes költség	Kis költség
Tesztorganizmus fenntartása	egyszerű	közepes	bonyolult
Műszer/anyag igény	nincs/ van	mikroszkóp/ van	nincs/nincs
Teszt kivitelezésének bonyolultság	egyszerű	hosszadalmas kiértékelés	hosszú előkészítés
Megbízhatóság	jó	közepes	jó

59. Táblázat Diplomamunkámban alkalmazott tesztorganizmusok érzékenységeinek összehasonlítása

	Ökotoxikológiai tesztek			
szennyezőanyag	<i>Folsomia candida</i> talajra	<i>Tetrahymena</i> <i>pyriformis</i> talajra	<i>Tetrahymena</i> <i>pyriformis</i> talajkivonatra	<i>Daphnia magna</i> talajkivonatra
Diesel olaj	igen érzékeny	kevésbé érzékeny	kevésbé érzékeny	igen érzékeny
fenantrén	kevésbé érzékeny	érzékeny	igen érzékeny	érzékeny
cypermetrin	érzékeny	érzékeny	érzékeny	igen érzékeny

A *Collembola* érzékenységről vizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy a Diesel olajra bizonyult a legérzékenyebbnek, annak illékonyága miatt, ezt követi a cypermetrin, míg a fenantrénre csak igen nagy koncentrációban mutatott érzékenységet.

A *Tetrahymena* közel azonos érzékenységet mutat a talaj szennyezőanyagaira, a Diesel olaj szennyezőanyag esetében kevésbé bizonyult érzékenynek, mint fenantrén és cypermetrin esetén. A pusztulás mind három esetben arányos volt mind az idővel, mind a talaj szennyezőanyag koncentrációjával.

Tetrahymena érzékenységről szennyezett talajból készült kivonaton végzett vizsgálatok alapján elmondható, hogy a lényegesen nagyobb, mint a háromfázisú talajban, tehát a felszín alatti víz azon kockázatának megítélésére, mely a talaj szennyezettségéből ered, nagyon megfelelő organizmus lehet. Egy-két nagyságrenddel nagyobb érzékenységet mutatott mind a három vizsgált szennyezőanyag esetében.

A *Daphnia* összehasonlítva a háromfázisú talajra alkalmazott két szárazföldi tesztorganizmussal (*Tetrahymena* és *Collembola*) érzékenységet mutatott. A szennyezett talajból készült kivonaton végzett vizsgálatok alapján elmondható, hogy a felszíni vízre vonatkozó kockázat megítélése többletinformációt ad a talajjal végzett vizsgálatokhoz képest.

Személyes tapasztalataink alapján hozzáteszünk néhány gyakorlati megjegyzést és javaslatot:

- a *Collembola* teszt kivitelezése egyszerűen megoldható, bonyolult előkészítést nem igényel. A tenyészet fenntartása nem költséges, speciális körülmények biztosítása nem szükséges. A mérés szórása nagyon függött a szennyezőanyagtól, Diesel olajra és cypermetrinre szabályos görbét kaptunk, fenantrén esetében viszont kísérleteinket többször is meg kell ismételni, gyakran előfordult, hogy csak többszöri ismétlés után kaptunk azonos eredményeket a párhuzamos mérésekkel.

Javaslat: A teszt időigénye 1 hét, ennek csökkentését érzékenyebb végpont keresésével kéne megoldani, pl. a Collembola légzésintenzitása, hőtermelése, stb.

- a ***Tetrahymena* teszt** előkészítése, mind a talajra, mind a talajkivonatra rendkívül idő- és munkaigényesnek bizonyult. A tenyészet fenntartásához szigorú termosztálás és állandó környezeti paraméterek szükségesek. Az igazi nehézséget a mikroszkópos kiértékelés okozta, mely a teszt idejének előrehaladtával egyre pontatlanabbul kivitelezhető, így egyszerre csak 3–4 minta követhető pontosan.

Javaslat: új végpont keresése, pl. légzés vagy enzimaktivitás,

- a ***Daphnia* teszt** hátrányai közé sorolnánk, hogy a *Daphnia* tenyészet fenntartása igen körülményes, sokévi tapasztalatot igényel, ugyanakkor a megfelelő korú és állapotú egyedekkel végzett tesztek igen megbízhatóak, gyorsan és egyszerűen kiértékelhetőek még nagyszámú minta esetén is.

A szennyezőanyagok szempontjából is nagy különbségek voltak a tesztorganizmusok között: Diesel olajra a *Folsomia candida*, fenantrénre a talajkivonatos *Tetrahymena* teszt, míg cypermetrin esetén a *Daphnia* teszt volt a legérzékenyebb.

Egyértelműen bizonyítást nyert az állati tesztek fontossága, az állati tesztorganizmusok kiterjedt használhatósága és a sikerült meghatározni a további fejlesztési irányokat. Az eredmények azt is bizonyították, hogy a scenáriók és a szennyezettség függvényében más és más tesztet, illetve tesztegyüttest kell választani.

6. Irodalomjegyzék

10/2000 (VI. 2.) KöM; FVM; KHVM együttes rendelete a felszín alatti és a földtani közegek minőségi védelméhez szükséges határértékekről, 2000

Bruckner: Szerves kémia 2. kiadás, 2/1 kötet, Budapest. Tankönyvkiadó, 1977

Cypermethrin A, Environmental Health Criteria 82, WHO Geneva, 1989

Cypermethrin B, Health and Safety Guide No 22. WHO Geneva, 1989

Crommentuijn, T.; Sijm, D. ; de Bruijn, J.; van Leeuwen, K. and van de Plassche, E.: Maximum permissible and negligible concentrations for some organic substances and pesticides. Journal of Environmental Management (2000) 58, 297–312, 2000

DIN 38412 *Photobacterium phosphoreum* lumineszcencia gátlásának vizsgálata, Német Szabvány, 1991

Fekete J.; Ratkai T.; Szepesi I.; Norovján Gy. A policiklusos aromás szénhidrogének előfordulása, rákkeltő hatása, metabolizmusa és meghatározása környezeti mintákban. Budapest, 1993

Fleit E.; Gulyás P.: Ökotoxikológia, Budapest. Vízgazdálkodási Intézet, 1989

Gruiz K.; Horváth B.; Molnár M.: Környezettoxikológia, Budapest. Műegyetemi Kiadó, 2001

Kádár I.: Kármentesítési Kézikönyv II. Budapest. Környezetvédelmi Minisztérium, 1998

Leitgib L.: Kőolajszármazékokkal szennyezett talajok remediációja. Diplomamunka, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 2002

MSZ 08-1721/30-1998: Talajtoxicitási vizsgálat *Azotobacter-es* talajblokk módszerrel, Magyar Szabványügyi Hivatal

MSZ 21470-88: 1993 Környezetvédelmi talajvizsgálatok. *Pseudomonas fluorescens* talajtoxicitási teszt, Magyar Szabványügyi Hivatal

MSZ 21976-17:1993 Települési szilárd hulladékok vizsgálata. Csíranövényteszt, Magyar Szabványügyi Hivatal

MSZ 21978-9:1998 Veszélyes hulladékok vizsgálata. Hulladékkivonatok készítése fizikai-kémiai vizsgálatokhoz, Magyar Szabványügyi Hivatal

MSZ 21978/30-1988 Veszélyes hulladékok vizsgálata. *Azotobacter agile* teszt, Magyar Szabványügyi Hivatal

MSZ EN ISO 6341:1998 vízminőség. A mobilitásgátlás meghatározása *Daphnia magna* Strauson (Cladocera, Crustacea), Magyar Szabványügyi Hivatal

Stefanovits P. ; Filep Gy. és Füleky Gy.: Talajtan, Budapest. Mezőgazda Kiadó, 1999

Swartjes F.A.: Risk-Based Assessment of soil and Groundwater Quality in the Netherlands: Standards and Remediation Urgency, Risk Analysis Vol.19, No.6, 1999

Szabó J. M.: A bioszféra mikrobiológiája II. Budapest. Akadémiai Kiadó, 1996

Tibiássy B.: Talajminták mikrobiológiai aktivitásának vizsgálata Sensomat légzésmérő készülékkel, Diplomamunka, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 2002

US-EPA 600/3-88-029, Protocol for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites A.8.6. Lettuce seed germination (*Lecura sativa*), 1989

Verschuere, K.: Handbook of Environmental Data of Organic Chemicals, 2nd ed. New York. Van Nostrand Reinhold Co., 1983

www.fjokk.hu, 2004