

## Szerves vegyületek toxicitásának vizsgálata csíranövényteszttel

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

A vegyi anyagoknak az emberre és az ökoszisztémára gyakorolt hatásaira a toxikológia illetve az ökotoxikológiai tesztek eredményeiből következtethetünk. Az emberre gyakorolt hatást az emberi anyagcserével hasonlóságot mutató, jól bevált tesztorganizmusok eredményei alapján, extrapolációval határozzuk meg.

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

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

### ***Dózis-válasz és koncentráció-válasz összefüggés***

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

Az ökotoxikológiában dózis helyett gyakran környezeti koncentrációval dolgozunk, mivel az ökoszisztémában, az ökoszisztéma tagjai esetében nem tudjuk ellenőrizni, hogy a környezetben lévő anyagból mennyi jut be a szervezetbe. A humántoxikológusok által ismert dózisoknak kitett (beinjektált, megettetett) állatokkal szemben, a környezettel szoros kapcsolatban lévő organizmus a vegyi anyagnak több expozíciós útvonalon keresztül is ki van téve. Például egy talajlakó ugróvilla teljes testfelületével érintkezik a talajjal, belélegzi a talajgőzöket, és ha éheznek, emésztés útján is juthat talaj a szervezetébe, tudniillik ilyenkor a tápanyagbőség állapotától eltérően, földet is eszik. A földigiliszta teljes külső és belső (bélrendszer) felületével érintkezik a talajjal. A növényi gyökerek és a mikroorganizmusok lokálisan kibocsátott anyagaikkal kölcsönhatásba lépnek a szennyezett talajjal, mobilizálják a környezetükben lévő anyagokat.

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

Az ökotoxikológiai mérés végpontja a biokémiai szinttől az organizmus és közösség szintjén keresztül az ökoszisztéma szintjéig bárhol megválasztható a cél függvényében. A mérhető végpont eredménye alapján gyakran további származtatott értékeket használunk fel a kockázat mértékének megállapításához, döntések előkészítéséhez. Emiatt meg kell különböztetnünk a mérés végpontját, - amely nem más, mint a tesztorganizmuson vagy más szinten közvetlenül mért érték-, és a teszt számítással származtatott vizsgálati végpontját. Gyakori mérési végpont a stressz-fehérjék megjelenése, enzimek aktivitása fénykibocsátás, mozgásképtelenség, halál, fajok kölcsönhatása, fajeloszlás, stb. A mérési végpontokból származtatott eredmény többletinformációt tartalmaz.

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

A koncentráció-hatás görbe szigmoid alakú, tulajdonképpen a növekvő koncentrációból adódó kumulált toxicitást mutatja a vegyi anyag koncentrációjának függvényében. Azonos a dózis-hatás görbék alakja is, de ott a vízszintes tengelyen a vegyi anyag vagy a környezeti minta mennyisége szerepel tömegségben megadva.

Két fő szempont szerint osztályozzuk az ökotoxikológiai tesztek. Az egyik a tesztelés időtartalma, a másik a tesztorganizmus faja, illetve a tesztrendszer fajösszetétele. A tesztelés időtartama szerint **akut** (rövid időtartam) és **krónikus** (hosszabb időtartam) teszteket különböztetünk meg.

### *Növényi tesztek*

A növényi tesztek esetében érdemes megkülönböztetni az egysejtű növényeket, vagyis algákat alkalmazó tesztek a magasabbrendűeket használóktól, ugyanis a növények általában érzékenyebbek a szennyezőanyagokra, mint a baktériumok. Számos bioteszt alacsonyabb- és magasabbrendű növényeket használ szennyeződések kimutatására.

- Algatesztek
- Magasabbrendű növényi tesztorganizmusok
- Csírázásgátlási teszt

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

A csírázásgátlási teszthez hasonló körülmények között, gyakran azonos kísérletben vizsgálják a kicsírázott magvak gyökereinek hosszát, amelyekből átlagot számítanak. Az alábbi táblázatban összefoglaltuk a növényi tesztorganizmusokkal szabványosított csírázásgátlásra, gyökér- vagy szárnövekedésre és biomasszanövekedésre alapozó, hazai és nemzetközi tesztek. A növények csírázásán, gyökér- és szárnövekedésén kívül egy sor növényi enzimaktivitás is felhasználható ökotoxikológiai vizsgálati végpontként.
- Fotoszintetikus aktivitást vizsgáló tesztek
- Biokémiai indikátorokat alkalmazó tesztek
- Szimbiotikus nitrogén kötési tesztek

	<b>US EPA FIT'RA (1982)<sup>a</sup></b>	<b>OECD (1984)</b>	<b>US EPA RCRA/ CERCL A<sup>b</sup> (1989)</b>	<b>US EPA TSCA<sup>c</sup> (1985)</b>	<b>US FDA<sup>d</sup> (1987)</b>	<b>APHÁ (1997)</b>	<b>MSZ 21976 (1993)</b>
Vizsgált fajok	káposzta sárgarépa kukorica uborka saláta hagyma angolperje zab szójabab	kínai kel zsázsa saláta bab mustár zab reték repce rizs	saláta	káposzta répa kukorica uborka saláta zab hagyma angolperje szójabab paradicsom	bab káposzta répa kukorica uborka saláta zab angolperje szójabab paradicsom	japán köles rizs amerikai rizs lótusz vízitorma vad rizs	fehér mustár
Minta elő- készítés	nincs	nincs	magok válogatása méret szerint	magok felületnek sterilizése	magok áztatása 1 órával a kísérlet előtt	20 perc áztatás hipo- kloritban	nincs
Teszt edény	Petri csésze, szűrőpapír, homok, talaj	műanyag tálka, szitált talaj	Petri csésze, szűrőpapír	Petri csésze, homok	Petri csésze, két réteg szűrőpapír	növesztő tál szűrőpapír	Petri csésze szűrőpapír
Tesztelt minta	oldat, kivonat, szilárd, stb.	mintaold at talajba keverve	4 cm <sup>3</sup> / mintatartó	oldat, kivonat, szilárd, stb.	nedvesített szűrőpapír	5 cm <sup>3</sup> / mintatartó	nedvesített szűrőpapír
Mag/ edény	10	5	5	15	50	15	25
Ismét- lések	4	>4	>3	3	6	4	2
Idő- tartam	5 nap	>14 nap	120 óra	>65% csírázott mag	>50% csírázott mag	120 óra	72 óra
Végpont	csírázás, gyökérnövek edés, biomassza tömege	LC <sub>50</sub> EC <sub>50</sub>	csírázás, gyökérnöv ekedés, EC <sub>50</sub>	csírázás, gyökérnövek edés	csírázás, gyökérnövek edés	csírázás, gyökérnöv ekedés, biomassza tömege	csírázás, gyökérnöve- kedés kontrollhoz viszonyított relatív %

## **Az MSZ 21976-17 szabvány alapján elvégzendő feladat**

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

**Alkalmasság:** pórusvízre, talajkivonatra és teljes talaj vizes szuszpenziójára.

**Testorganizmus:** fehér mustármag (*Sinapis alba*), vetőmagboltban beszerezhető

***Sinapis alba* érzékenysége:** a szennyező anyagok széles skálájára érzékeny.

**Végpont:** csírázásgátlás a kontrollminta százalékában, szár és gyökérnövekedés-gátlás a kontroll százalékban megadva, vagy EC<sub>50</sub> és EC<sub>50</sub> a minták hígítási sorozatából.

**Vizsgálat elve:** Szilárd hulladékok kivonatából készült hígításokat vizsgálunk, egy nedvesített szűrőpapírra helyezett, friss, kezeletlen, azonos méretű és színű fehér mustármagokkal. a környezetkárosító, mérgező hatásra, a kontrollhoz viszonyított gyökérnövekedés mértékéből következtetünk.

**Vizsgálati körülmények:** Természetes és mesterséges fénytől mentesített szobahőmérsékletű helyiség (20-23 °C)

**Eszközök, anyagok:** 9 cm átmérőjű Petri-csésze, szűrőpapír, szárítószekrény, mérőlombikok (25cm<sup>3</sup>, 50cm<sup>3</sup>), pipetta, csipesz, mérőhenger.

**Szükséges műszerek:** műszer nem szükséges, csak vonalzó, kiértékelés vizuális

**Vizsgálat végrehajtása:** A Petri-csészék átmérőjénél, kisebb szűrőpapírt elhelyezzük a csészébe, majd szárítószekrényben kiszárítjuk. Ezután elkészítjük a hígításokat ötszörös tízszeres, ötvenszeres, százszoros, ötszázszoros, és ezerszeres arányban. Az eredeti kivonatból, a hígításokból valamint a kontrollból 5-5 ml-t a 2-2 db szobahőmérsékletre hűlt Petri-csészébe pipetázunk. Ügyelni kell arra, hogy a szűrőpapír alatt légbuborék ne legyen. Majd ezekre 25-25 db mustármagot helyezünk el laza áttekinthető elrendezésben. A csészéket lefedve 72 órán keresztül egy szobahőmérsékletű elsötétített helyre helyezzük. Az megfelelő idő elteltével a tesztedyedeket egyenként lemérjük és meg határozzuk a két mérés számtani középértékét.

**Eredmény megadása:** A gyökérnövekedés-gátlását a kontrollközegben kicsírázott magvak gyökerének hosszúságához viszonyítva, százalékban adjuk meg, koncentrációkként a következő összefüggéssel:

$$X = \left( \frac{K - M}{K} \right) * 100$$

X - Gyökérnövekedés-gátlás %

K - Kontroll magvak gyökérhossza

M - Kezelt magvak gyökérhossza

Milliméterpapíron ábrázolja a koncentráció-hatás görbét! Határozza meg az  $EC_{50}$  értékét!

