



Modern Mérnöki Eszköztár Kockázatközpontú
Környezetmenedzsment Alapjául

MOKKA KONFERENCIA
2007. június 15.

***INTERAKTÍV KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIAI
TESZTEK TALAJRA***

Molnár Mónika és Gruiz Katalin

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Bevezetés

- A fizikai-kémiai analitikai módszerek önmagukban nem adnak elegendő információt egy szennyezőanyag környezeti kockázatának megítéléséhez, felméréséhez.
- A hagyományos „kémiai analitikai szemlélet” problémái:
nem veszi figyelembe
 - a szennyezőanyag mobilitását
 - megoszlását a környezeti elemek különböző fázisa között
 - biodegradációját
 - bioakkumulációját
 - a kölcsönhatásokat a komplex szennyezőanyag-talaj-biota rendszerben
 - ismeretlen átalakulási termékek keletkezését...



BIOLÓGIAI és KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIAI MÓDSZEREK

Környezettoxikológiai tesztek

A teljes talaj, mint mátrix és élőhely jellemzése

Talajkivonat vagy teljes talaj?

- A szennyezőanyag megoszlása a talaj fázisai között nem egyensúlyi
 - Az extrahálószer kiválasztása problémás
 - Talajkivonat tesztelésével túl- vagy alábecsülhető a toxicitás
- Elfedi a biológiai hozzáférhetőség okozta különbségeket



A valós helyzetet modellezése

A természeteshez hasonló kölcsönhatás

**A teljes talaj direkt kontakt tesztelése – interaktív
környezettoxikológiai tesztek**

Interaktív környezettoxikológiai tesztek talajra

Direkt kontakt toxicitási tesztek

A toxicitási tesztek eredményei magukban foglalják és jellemzik:

- a kémiai analízissel nem mérhető vegyi anyagok hatását;
- több szennyezőanyag együttes hatását;
- a környezeti elem mátrixa, a szennyezőanyag és a biota között fellépő kölcsönhatásokat;
- a talaj szennyezőanyag-kötő képességét
- a szennyezőanyag biológiailag hozzáférhető mennyiségét;
- az analitikai programba be nem vett szennyezőanyagok hatását...



A teljes talajt, mint mátrixot és élőhelyet jellemzik

Módszerfejlesztések

1. Egy fajt alkalmazó direkt kontakt laboratóriumi biotesztek

- bakteriális, növényi és állati tesztorganizmusok
- közvetlen kontaktus a tesztorganizmus és a talaj között

2. Az egészséges talaj, mint tesztorganizmus alkalmazása

- a mikrokozmosz tesztek egy speciális megoldása talajoknál
- egy átlagos, jó minőségű referencialtalaj aktivitásait vesszük alapul
- a referencialtalaj ökoszisztémáját tesszük ki a szennyezőanyagot tartalmazó tesztelendő környezeti minta hatásainak

3. Talajmikrokozmosz alkalmazása

- kisméretű, sokfajú, mesterségesen összeállított és fenntartott rendszer
- a szennyezőanyagok környezetben való viselkedésének jellemzése komplex ökológiai rendszerben

Vibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt

- Tesztorganizmus: *Vibrio fischeri* NRRLB – 11177

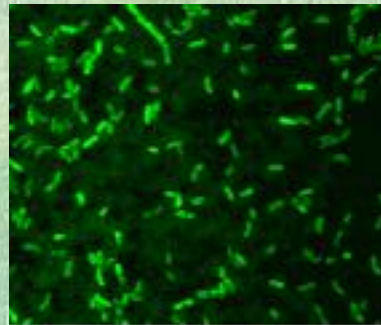


Vibrio fischeri egy tengeri baktérium, mely optimális körülmények között, anyagcseréje során fényt bocsát ki. A kurtafarkú tintahal a *Vibrio fischeri*-t magában hordozza egy speciális szervben, az úgynevezett "fényszervben".

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



Kurtafarkú tintahal
Euprymna scolopes



Baktériumszuszpenzió
mikroszkópos képe
(fluoreszcens festett sejtek)



Folyadék kultúra
jól megvilágított
helyen

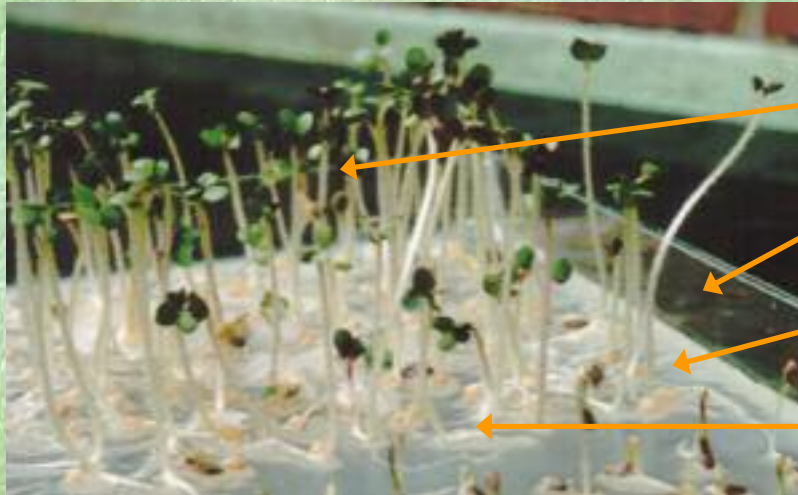


Folyadék kultúra
sötétben

Vibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt

- **Teszt típusa:** egy fajt alkalmazó, bakteriális, akut toxicitási teszt;
- **Alkalmas:** pórusvízre, talajkivonatra és a teljes talaj vizes szuszpenziójára;
- **Tesztorganizmus:** *Vibrio fischeri* laboratóriumban könnyen fenntartható;
- **A *Vibrio fischeri* érzékenysége:** mind nehézfémekre, mind szerves makro- és mikroszennyezőkre érzékeny;
- **Végpont:** lumineszcencia intenzitáscsökkenése, a minta hígítási sorából EC_{20} , EC_{50} illetve ED_{20} , ED_{50} határozható meg;
- **Szükséges műszer:** luminométer;
- **Tesztelés időtartama:** 30 perc;
- **Szabvány módszerek:** DIN 38412 (1991), teljes talajra adaptált és direkt kontaktra kidolgozott változat: BME-ABÉT;
- **Alkalmazási terület:** előzetes és részletes állapotfelmérés, kockázatfelmérés, remediáció követése, utómonitoring.

Növényi biotesztek



Csíranövény

Üvegtálca

Agarral kevert talaj

Növényi gyökerek az agar felszínén

- Alkalmazott teszt növények: fehér mustár (*Sinapis alba*), borsó (*Pisum sativum*), kerti zsázsa (*Lepidum sativum*), retek (*Raphanus sativus*), búza (*Triticum sativum*), zab (*Avena sativa*) és kukorica (*Zea mays*).
- A növényi magokat közvetlenül a talajba (v. agarral kevert talajba) ültetjük → direkt kontakt a növényi gyökerek és a talaj között.
- Az akut tesztekben a növényi gyökér- és szárhossz-növekedést mérjük.

Sinapis alba gyökér-, szárnövekedés gátlási teszt

- **Teszt típusa:** egy fajt alkalmazó, növényi, akut toxicitási teszt.
- **Alkalmas:** pórusvízre, talajkivonatra és a teljes talaj vizes szuszpenziójára.
- **Tesztorganizmus:** fehér mustár (*Sinapis alba*): A magok vetőmagboltban beszerezhetők.
- **A *Sinapis alba* érzékenysége:** a szennyezőanyagok széles skálájára érzékeny.
- **Végpont:** csírázásgátlás a kontroll minta százalékában, szár és gyökernövekedés gátlás százalékban megadva, vagy ED₂₀ és ED₅₀ a minták hígítási sorozatából.
- **Szükséges műszer:** vonalzó, vizuális értékelés.
- **Tesztelés időtartama:** 72 óra.
- **Szabvány módszer:** MSZ 21976-17 (1994); direkt kontaktra kidolgozott változat: BME-ABÉT.

Folsomia candida mortalitási teszt

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

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

A vizsgálathoz azonos korú (14 napos) állatkák szükségesek



Kifejlett egyedek (1,8 mm)
petékkal



Kifejlett egyedek (2 mm) with
juveniles



Kifejlett egyed (2,0 mm).

Folsomia candida mortalitási teszt

- **Teszt típusa:** egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, állati, akut toxicitási és krónikus (reproduktív) teszt. Mikrokozmosz tesztként is alkalmazható.
- **Alkalmas:** teljes talajra közvetlenül, talajkivonatként standard talajra itatva.
- **Tesztorganizmus:** *Folsomia candida*, ugróvillás *Collembola*.
- **A *Folsomia candida* érzékenysége:** nehézfémekre kevésbé, szerves szennyezőanyagokra érzékeny, főleg az illékonyakra és a bőrön át felszívódókra.
- **Végpont:** hígításból ED₂₀ és ED₅₀, reprodukciós teszténél NOEC.
- **Szükséges műszer:** citoplaszt mikroszkóp vagy vizuális.
- **Tesztelés időtartama:** akut: 5-10 nap, reprodukciós: 20 nap.
- **Szabványosított formában:** ISO 11267 (1999)
- **Megjegyzés:** jól reprodukálható, könnyen kivitelezhető teszt.

A környezettoxikológiai tesztek értékelése és interpretációja

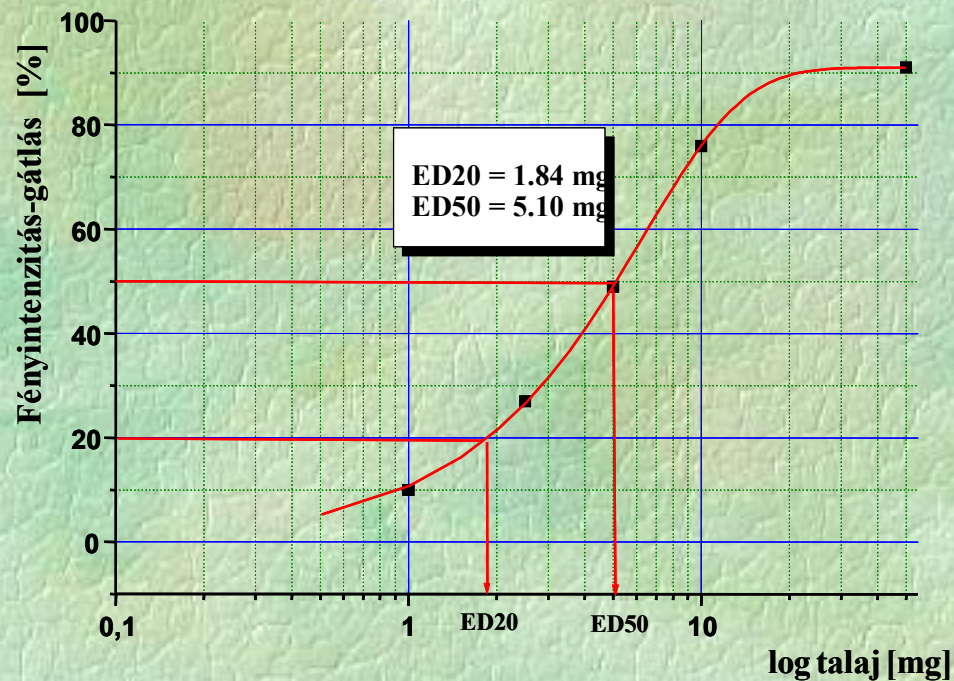
- A toxikus végpontok meghatározása a *dózis–válasz* (*koncentráció–válasz*) összefüggés vizsgálata alapján
 - A szennyezett talaj növekvő mennyiségeinek (dózisainak) függvényében mérjük a hatást, és vesszük fel a *dózis–válasz* görbét
 - A dózis–válasz görbe illesztése, és a görbéről a 20 ill. 50 %-os gátláshoz tartozó ED_{20}/ED_{50} és LD_{20}/LD_{50} értékek meghatározása a *Microcal Software™ ORIGIN® 6.0* programmal
 - ED_{20}/ED_{50} – Hatásos dózis (*Effect Dose*), mely a mérési vagy vizsgálati végpont 20, 50 %-os csökkenését okozza.
 - *Vibrio fischeri* teszt esetén a toxicitás kifejezése: rézekvivalens-koncentrációban (rézegyenértékben – ΣCU)
- A rézkoncentráció függvényében felvett *koncentráció–válasz* görbe un. "kalibrációs görbe" segítségével
- A végeredmény megadása Cu-egyenértékben:
$$\Sigma Cu_{20} = (ED_{20} Cu / ED_{20} minta) * 10^6 \text{ [mg Cu / kg talaj]}$$
$$\Sigma Cu_{50} = (ED_{50} Cu / ED_{50} minta) * 10^6$$

Értékelés és interpretáció

Vibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt

Dózis–válasz összefüggés a szennyezett talaj növekvő mennyiségének függvényében

A talajminták toxikusságának jellemzése ΣCu_{20} / ΣCu_{50} alapján



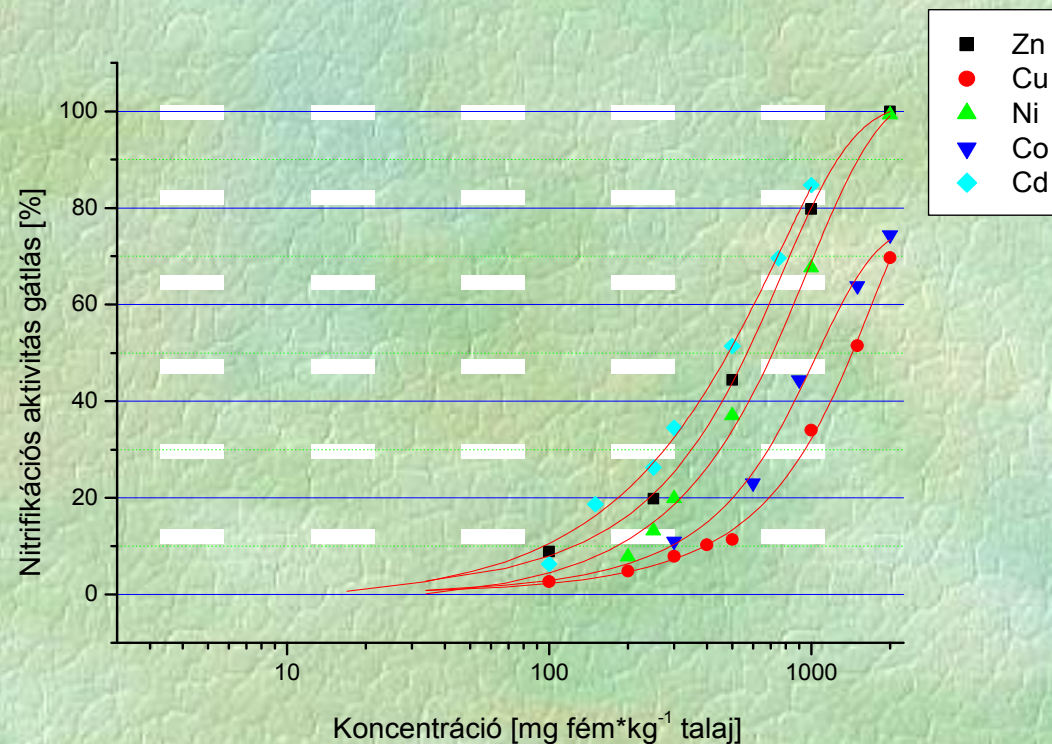
| ΣCu_{20} [mg Cu / kg talaj] | ΣCu_{50} [mg Cu / kg talaj] | Jellemzés |
|---|---|----------------|
| < 80 | < 120 | Nem toxikus |
| 80-250 | 120-300 | Enyhén toxikus |
| 250-400 | 300-500 | Toxikus |
| > 400 | > 500 | Nagyon toxikus |

Az „egészséges talaj, mint tesztorganizmus”

- Az „egészséges talaj, mint tesztorganizmus”, az egy fajt alkalmazó tesztekhez hasonlóan, alkalmazható toxicitási tesztekben
- Jó minőségű, egészséges referencia talaj szükséges
- A referencialtalaj aktivitásait vesszük alapul
- A garantált és állandó minőségű referencialtalaj ökoszisztémáját tesszük ki a szennyezőanyagot tartalmazó tesztelendő környezeti minta hatásainak
- A referencia talajhoz különböző mennyiségű vizsgálandó környezeti mintát téve „koncentráció-sorozatot” állítunk elő, ED_{20} , ED_{50} értékeket határozzuk meg
- Az általunk kifejlesztett módszerekben a teszt végpontja: a nitrifikációs aktivitás és a légzés

„Az „egészséges talaj, mint tesztorganizmus” Nitrifikáció gátlási teszt

- Toxikus fémekkel szennyezett talajok nitrifikációs aktivitásának gátlását teszteltük.
- Jó nitrifikációs aktivitással rendelkező, szennyezetlen kerti talajt alkalmaztunk tesztorganizmusként.
- A kerti talajhoz különböző mennyiségű vizsgálandó mintát téve koncentrációsorozatot állítunk elő, s mértük a keverék nitrifikáló aktivitásának változását.

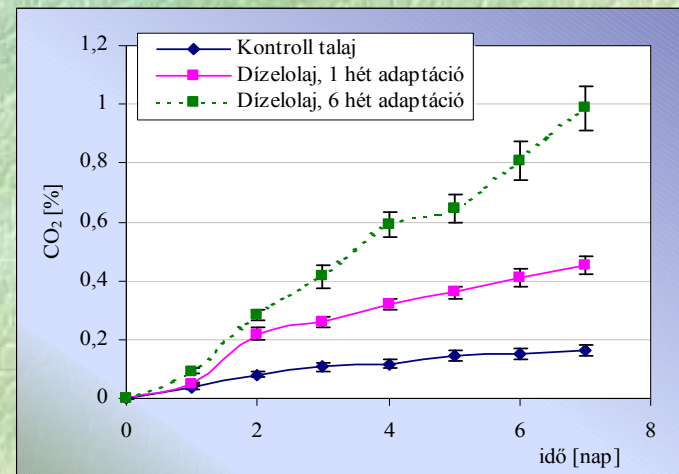
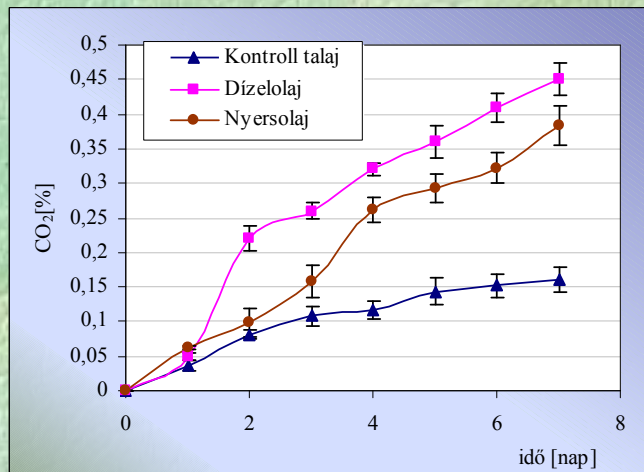
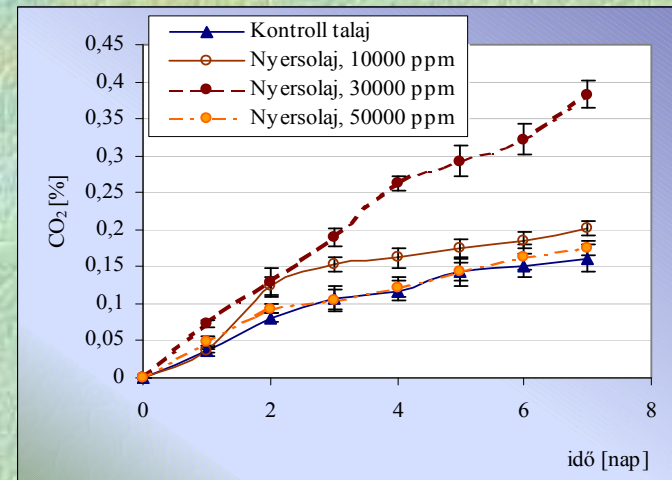
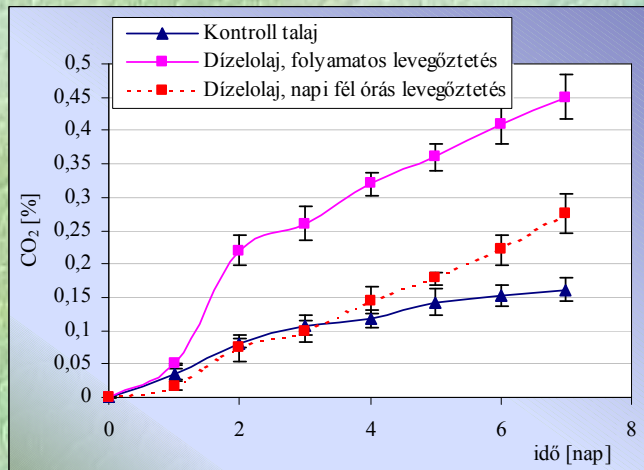


Talajmikrokozmosz

- A mikrokozmosz kisméretű, sokfajú, mesterségesen összeállított és fenntartott ökológiai rendszer.
- Komplex folyamatok és kölcsönhatások vizsgálatára, időbeli követésére is alkalmas.
- *Ex situ* és *in situ* technológiák modellezésére is alkalmazható.
- Céltól függően vizsgálható és mérhető:
 - A talajlégzés és különböző enzimaktivitások abszolút értéke,
 - A természetes és a kísérleti folyamatokban bekövetkező változások,
 - A szennyezőanyagok hatására bekövetkező változások,
 - Technológiai paraméterek változtatására fellépő hatások...

Szénhidrogének biodegradációjának jellemzése és követése talajlégzés mérésével talajmikrokozmoszban

Talajmikrokozmoszban (levegőztethető töltött oszlopreaktorban) követtük és értékeltük a levegőztetés intenzitásának, a szénhidrogének típusának és koncentrációjának, valamint az adaptáció időtartamának hatását a biodegradációra.



Az új környezettoxikológiai módszerek főbb jellemzői

- Akut és krónikus tesztek
- **Végpontok:** túlélés, növekedés, fénykibocsátás, légzés, enzimaktivitások, reprodukció stb. (vizuálisan, műszerekkel, távérzékeléssel, kémiai analitikai módszerekkel)
- **Tesztorganizmusok:** bakteriális, növény és állati tesztorganizmusok az egy fajt alkalmazó tesztekben; teljes talaj (jó minőségű, egészséges referencia talaj) mikrokozmoszban
- **Módszerek:** egy fajt alkalmazó vagy többfajú (mikrokozmosz) teszt-rendszerek; mikrokozmoszok az expozíciós scenárió modellezésére
- **Értékelés:** ED₂₀ (LD₂₀) és ED₅₀ (LD₅₀) értékek meghatározása dózis-válasz görbe alapján ORIGIN 6.0 szoftverrel
- **Interpretáció:** a toxicitás rézekvivalens koncentrációban való kifejezése (*Vibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt esetén) → hatás-rézkoncentráció „kalibrációs görbével”
- **Alkalmazási lehetőségek:** toxicitás, mutagenitás, teratogenitás, biológiai hozzáférhetőség mérése, megoszlás, biodegradálhatóság, bioakkumuláló képesség ...

Köszönöm a figyelmet!

