



**Modern Mérnöki Eszköztár Kockázatalapú
Környezetmenedzsment megalapozásához
(MOKKA)**

1. jelentés

BME II.2a.2.

**Interaktív környezettoxikológiai tesztek,
elterjedtségük Magyarországon és Európában –
áttekintés
Tanulmány**

**Készítette:
Feigl Viktória**

1. Bevezetés

Ebben a tanulmányban áttekintést kívánunk nyújtani az interaktív, azaz direkt kontaktot alkalmazó, talajok vizsgálatára alkalmas környezettoxikológiai tesztek elterjedtségéről Magyarországon és Európában. A tanulmány felépítése:

- Az interaktív tesztek előnyei a nem direkt kontaktot, hanem például talajkivonatot alkalmazó tesztekkel szemben.
- A Magyarországi helyzet: a nálunk szabványosított interaktív tesztek, a szabványok rövid leírása.
- Az Európai helyzet: ISO szabványok, melyek (még) nem magyar szabványok, a szabványok rövid leírása.
- A tanszéken fejlesztett és alkalmazott direkt kontaktot tesztek rövid áttekintése.

A tesztmódszereket a tesztorganizmusok alapján csoportosítottuk.

2. Interaktív tesztek előnyei

A toxikológiai tesztek többnyire egyszerű laboratóriumi vizsgálatok, így az abiotikus viszonyokat (hőmérséklet, páratartalom, minta állaga) csak kevésbé veszik figyelembe. A szennyezőanyagokat a természetes viszonyaiból kiemelve, vagy megváltoztatva hozzák kapcsolatba a tesztorganizmussal, ami módosíthatja a szennyezőanyag hozzáférhetőségét és ezáltal az aktuális toxicitását.

A legtöbb jelenleg használt talajvizsgálatra alkalmas bioteszt például, a talaj extrahálószeres kivonatát vizsgálja, elhanyagolva a szennyezőanyag-talajszemcse, tesztorganizmus-talajszemcse (biofilm), tesztorganizmus–talajszemcse–szennyezőanyag kapcsolatokat és a hozzáférhetőséget (Gruiz, 1994 és 1998).

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

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

Kutatócsoportunk direkt kontakt (interaktív) tesztek alkalmazását és fejlesztését, mivel ezek figyelembe veszik a tesztorganizmus–talajszemcse–szennyezőanyag kapcsolatokat és a hozzáférhetőséget. A BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén több, saját környezettoxikológiai tesztet kifejlesztettünk. A módszerek alkalmasak a vizsgálandó talaj előzetes minősítésére, szennyezett területek kockázatának megítélésére, bioremediációs technológiák megalapozását szolgáló laboratóriumi, illetve szabadföldi kísérletek követésére, valamint a remediált területek utólagos monitorozására.

3. Magyarországon szabványosított interaktív teszt módszerek talajra

Jelenleg Magyarországon biológiai talajvizsgálatokra vonatkozóan 12 db szabvány van érvényben, illetve 8 db előkészítés alatt áll. A 12 érvényes szabvány közül 3 db magyar szabvány, míg a többi öt ISO szabványok fordítása. A régóta érvényben lévő magyar szabványok között találunk kettőt, amelyekkel a talajok mikrobiológiai állapota jellemezhető (MSZ 21470-77:1988 és MSZ 08-1931:1984), illetve egy toxikológiai tesztet *Pseudomonas fluorescens* baktériummal (MSZ 21470-88:1993), amely azonban nem direkt kontakt teszt, hanem talajkivonatot használ.

A friss szabványok (2003-tól) közül kettő a talaj mikrobiális biomasszájának meghatározásával (MSZ ISO 14240-1:2003 és MSZ ISO 14240-2:2003), kettő szerves vegyi anyagok aerob biológiai lebonthatóságának vizsgálatával (MSZ ISO 11266:2004 és MSZ ISO 14239:2004) foglalkozik. A fennmaradó öt darab szabvány tartalmaz olyan ökotoxikológiai módszereket, amelyek talajok vizsgálatára alkalmasak és direkt kontaktot alkalmaznak a talaj és a tesztorganizmus között.

Ezek közül a szabványosított interaktív tesztek között két növényi, két állati és egy olyan teszt szerepel, amely a talajt magát, mint tesztorganizmust használja. A talajra alkalmas bakteriális toxikológiai tesztek teljesen hiányoznak. Az előkészületben lévő szabványok között azonban újabb 4 toxikológiai teszt szerepel, a másik négy a talaj gerinctelen állatainak szelektálására vonatkozik. Az új négy módszer között egy növényi, két állati és egy bakteriális teszt szerepel.

3.1 Növényi tesztek

3.1.1 Talajminőség. A szennyező anyagok talajflórára gyakorolt hatásának meghatározása, 1. rész: A gyökérnövekedés-gátlás mérési módszere, MSZ ISO 11269-1, 2003. november, (A szabvány teljesen megegyezik az ISO 11269-1:1993 nemzetközi szabvánnyal)

A módszer elve:

Előcsíráztatott magvakat az alkalmazott teszt növénytől függő szabályozott körülmények között, meghatározott időtartamig termesztjük. A két kontrollközeg ipari homok és talaj. A termesztési időszakot követően a kontroll és az ismeretlen vagy vizsgált anyaggal kezelt talajból származó gyökerek hosszát mérjük. A hatást a tesztközegben növesztett gyökerek kontrollhoz viszonyított különbségének statisztikailag szignifikáns különbsége mutatja.

3.1.2. Talajminőség. A szennyező anyagok talajflórára gyakorolt hatásának meghatározása, 2. rész: Vegyi anyagok hatása a magasabb rendű növények kikelésére és növekedésére, MSZ ISO 11269-2, 2003. november, (A szabvány teljesen megegyezik az ISO 11269-1:1995 nemzetközi szabvánnyal)

A módszer elve:

Ez a fitotoxicitási teszt a különböző szárazföldi növényfajoknak a teszt talajhoz különböző koncentrációkban adott vegyi anyagra adott kikelési és korai növekedési reakcióján alapul. A kiválasztott növényfajok magvait a vizsgálandó anyagot tartalmazó cserépbe, valamint egy kontrollcserépbe ültetjük. A cserepeket a kiválasztott teszt fajnak megfelelő termesztési feltételek között tartjuk. A teszt növények hajtásainak kikelését és tömegét (száraz vagy zöld) összehasonlítjuk a kontroll növények hasonló adataival.

3.2 Állati tesztorganizmust alkalmazó módszerek

3.2.1 Talajminőség. A szennyező anyagok hatása a földigilisztára (*Eisenia fetida*), 1. rész: Az akut toxicitás meghatározása mesterséges talajban, MSZ ISO 11268-1, 2003. október, (A szabvány teljesen megegyezik az ISO 11268-1:1993 nemzetközi szabvánnyal)

A módszer elve:

A vizsgálandó anyag különböző koncentrációit tartalmazó, meghatározott mesterséges talajba (10% tőzegmoha, 20% kaolinitagyag, 70% ipari kvarchomok) helyezett, kifejlett földigiliszták (*Eisenia fetida* faj) százalékos mortalitását határozzuk meg 7 és 14 nap után. A vizsgálandó anyagot egy lépésben adjuk a mesterséges talajhoz és a tesztet a vizsgálandó anyagok utánadagolása nélkül fejezzük be. A tesztekkel kapott eredményeket összehasonlítjuk egy kontrollal, és felhasználjuk annak a koncentrációnak a becslésére, amely a földigiliszták 50%-os mortalitását okozza (LC 50, 14 nap).

3.2.2 Talajminőség. A szennyező anyagok hatása a földigilisztára (*Eisenia fetida*), 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, MSZ ISO 11268-2, 2003. október, (A szabvány teljesen megegyezik az ISO 11268-2:1998 nemzetközi szabvánnyal)

A módszer elve:

A vizsgálandó anyag különböző koncentrációit tartalmazó, meghatározott mesterséges talajba (10% tőzegmoha, 20% kaolinitagyag, 70% ipari kvarchomok) helyezett, kifejlett földigiliszták (*Eisenia fetida fetida* vagy *Eisenia fetida andrei* faj) szaporodására, növekedésére és százalékos mortalitására gyakorolt hatásokat határozzuk meg. A vizsgálandó anyag egyszeri alkalmazásával a mortalitásra és a biomasszára gyakorolt hatásokat 4 hét múlva határozzuk meg. A szaporodásra gyakorolt hatást a petegubókból kikelt utódok számlálásával határozzuk meg egy további négyhetes időszak után. Kontrollal összehasonlítva meghatározzuk a NOEC (a vegyi anyag a mesterséges talajjal elegyítve nincs szignifikáns hatással a petegubókból kikelt utódok számára) és LOEC (legkisebb hatásos koncentráció) értékeket.

3.3 Talaj, mint tesztorganizmus

3.3.1 Talajminőség. Biológiai módszerek. A nitrogénmineralizáció és a nitrifikáció meghatározása talajban, valamint a vegyi anyagok ezen folyamatokra gyakorolt hatása, MSZ ISO 14238, 2004. január, (A szabvány teljesen megegyezik az ISO 14238:1997 nemzetközi szabvánnyal)

A módszer elve:

Aerob talajokban a N-mineralizáció sebességét vagy mértékét a talaj szerves anyagában lévő nitrogén vagy hozzáadott nitrogéntartalmú szerves vegyület mineralizációja során felszabaduló ammónium, nirit és nitrát koncentrációjának méréséve határozzuk meg. A vegyi anyagoknak a N-mineralizációra kifejtett hatását úgy határozzuk meg, hogy a talajt könnyen bomló szerves nitrogén-forrással javítjuk, és a különböző mennyiségű vegyi anyaggal kezelt részmintákban lemérjük a N-formák százalékos gátlását egy kezeletlen ellenőrző mintához képest.

4. Egyéb nemzetközi (ISO) szabványok, melyek nincsenek meg magyar szabványként

A talajra alkalmazható direkt kontakt tesztek, amelyek Magyarországon is elfogadottak, mind ISO szabványok fordításai. Az ISO (International Organization of Standardization) nemzetközi szabványai között azonban a Magyarországon is szabványként elfogadottakon kívül több interaktív teszt szerepel. További három növényi teszt, három állati teszt és egy olyan, amely a talajt, mint tesztorganizmust vizsgálja.

4.1 Növényi tesztek

4.1.1 Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants, ISO 11269-2:2005, (Előkészületben magyar szabványként: ISO/FDIS 11269-2)

Abstract

ISO 11269-2:2005 describes a method that is applicable to the determination of possible toxic effects of solid or liquid chemicals incorporated in soil on the emergence and early stages of growth and development of a variety of terrestrial plants. It does not give an indication of damage resulting from direct contact of seedlings with the chemical in the vapour or liquid phase outside the soil environment. The method is also applicable to the comparison of soils of known and unknown quality.

4.1.2 Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.), ISO 17126:2005

Abstract

ISO 17126:2005 specifies test procedures for the determination of effects of contaminated soils or other contaminated samples on the emergence of lettuce seeds. ISO 17126:2005 is applicable to contaminated soils, soil materials, compost, sludge and chemical testing. It is applicable to the measurement of effects of substances deliberately added to the soil and to the comparison of soils of known and unknown quality. ISO 17126:2005 is not applicable to volatile contaminants.

4.1.3 Soil quality -- Biological methods -- Chronic toxicity in higher plants, ISO 22030:2005

Abstract

ISO 22030:2005 describes a method for determining the inhibition of the growth and reproductive capability of higher plants by soils under controlled conditions. Two species are recommended: a rapid-cycling variant of turnip rape (*Brassica rapa* CrGC syn. Rbr) and oat (*Avena sativa*). The duration of test should be sufficient to include chronic endpoints that demonstrate the reproductive capability of the test plants. By using natural test soils, e.g. from contaminated sites or remediated soils, and by comparing the development of the test plants in these soils with reference or standard control soils, the test is applicable to assess soil quality, especially the function of the soil as a habitat for plants. This method can be modified to allow use of the chronic plant assay for the testing of chemicals incorporated into soil. By preparing a dilution series of a test substance in standard control soils, the same endpoints can be measured to assess the chronic toxicity of chemicals. This method is not applicable to

volatile substances, i.e. substances for which Henry's constant or the air/water partition coefficient is greater than 1, or for which the vapour pressure exceeds 0,013 3 Pa at 25 °C.

4.2 Állati tesztorganizmust alkalmazó módszerek:

4.2.1 Soil quality -- Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) -- Determination of the effects on growth by soil contamination, ISO 15952:2006, (Előkészületben magyar szabványként: ISO/DIS 15952)

Abstract

ISO 15952:2005 specifies a semi-static method for the determination of the effects of contaminants on growth and survival of young snails, usually *Helix aspersa aspersa* Müller. The animals are exposed via the cutaneous and digestive route using a test substrate (artificial or natural soil according to the objective of the study) to which defined amounts of the following are added: substances or preparations; and soils (contaminated or of unknown quality) or waste materials. A static method is also described. ISO 15952:2005 does not apply to volatile substances, i.e. substances for which the Henry constant, H, or the air/water partition coefficient is over 1, or for which the vapour pressure is over 0,013 3 Pa at 25 °C. This test takes into account possible changes in the test substance, preparation, soil or waste material because the test mixture is prepared and renewed every 7 days during the 28-day test period.

4.2.2 Soil quality -- Effects of pollutants on insect larvae (*Oxythyrea funesta*) -- Determination of acute toxicity, ISO 20963:2005

Abstract

ISO 20963:2005 describes a method for the determination of the effects of contaminated soils and substances on the survival of the larvae of *Oxythyrea funesta*. The larvae are exposed to the pollutants by cuticular and alimentary uptake. For contaminated soils, the effects on the survival are determined in the test soil and in a control soil. Depending on the objectives of the study, the control and dilution substrates (dilution series of contaminated soil) are either uncontaminated soil comparable to the soil sample to be tested or artificial soil substrate. Effects of substances are assessed using a defined artificial soil substrate.

ISO 20963:2005 is not applicable to volatile substances, i.e. substances for which Henry's constant or the air/water partition coefficient is greater than 1, or for which the vapour pressure exceeds 0,001 33 Pa at 25 °C. This method does not take into account the possible degradation of the substances or pollutants during the test.

4.2.3 Soil quality -- Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) -- Determination of effects on reproduction and survival, ISO 16387:2004

Abstract

ISO 16387:2004 describes a method for determining the effects of substances or contaminated soils on reproduction and on survival of the worm *Enchytraeus albidus* (*Enchytraeidae*). The animals are exposed to the substances by dermal and alimentary uptake using a defined artificial soil substrate to which specified amounts of that substance are added, or by using a soil substrate of unknown quality.

ISO 16387:2004 is applicable to test substances that are either insoluble or soluble in water, although the method of application differs. The method is not applicable to volatile test substances, i.e. substances for which H (Henry's constant) or the air/water partition coefficient

is greater than 1, or for which the vapour pressure exceeds 0,013 3 Pa at 25 °C. For optimum applicability, the water solubility and the vapour pressure of the test substance should be known. Additionally, information on the persistence of the test substance in soil is desirable.

Basic information on the ecology and ecotoxicology of *Enchytraeidae* in the terrestrial environment can be found in the bibliographic references. The stability of the test substance cannot be ensured over the test period. No provision is made in the test method for monitoring the persistence of the test substance. Recommendations for adapting the method to comparing or monitoring soil quality are given in Annex B.

4.3 Talaj, mint tesztorganizmus:

4.3.1 Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration, ISO 16072:2002

Abstract

ISO 16702:2002 describes methods for the determination of soil microbial respiration of aerobic, unsaturated soils. The methods are suitable for the determination of O₂ uptake or CO₂ release, either after addition of a substrate (substrate-induced respiration), or without substrate addition (basal respiration). ISO 16702:2002 is applicable to the measurement of soil respiration in order to:

- determine the microbial activity in soil (see [2]);
- establish the effect of additives (nutrients, pollutants, soil improvers, etc.) on the metabolic performance of microorganisms;
- determine the microbial biomass (see [3]);
- determine the metabolic quotient qCO₂.

5. A tanszéken kifejlesztett interaktív tesztek talajra

Itt ismertetjük azokat az interaktív tesztek, melyeket saját magunk fejlesztettünk ki a BME MGKT-n talajok, üledékek és pórusvíz vizsgálatára.

A tesztorganizmus és a talaj direkt érintkezése talajnedves állapotban vagy iszapállagban történhet. Egyes teszteknel szárított és porított talajt használunk, és azt utólag nedvesítjük, más esetekben az eredeti földnedves állapotú talajt használjuk. Egyes bakteriális teszt módszereknél a talaj előzetes sterilizációja is szükséges lehet.

A teszteknel hígításra és/vagy összehasonlításként OECD talajt vagy ismert, bizonyítottan tiszta erdei talajt használunk. Az OECD talaj tőzegekből és agyagásványokból összeállított, állandó minőségű, mesterséges talaj.

5.1 Bakteriális biotesztek

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

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

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

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

5.2 Növényi tesztek

A növényi tesztorganizmusok közül a fehér mustárra (*Sinapis alba*) és a kerti zsázsára (*Lepidum sativum*) dolgoztunk ki direkt kontakt tesztet. Hasonló módon más növényekkel is lehet tesztelést folytatni, ha a növény eleget tesz a laboratóriumi munka követelményeinek. A növényekkel végzett tesztek során egyazon kísérletben mérhetjük a csírázóképeség gátlását, valamint a gyökér- és szárnövekedés gátlást. Ha a biomassza mennyisége vagy a bioakkumuláció a végpont, akkor nagyobb méretű tenyészedényes kísérletekre van szükség.

5.3 Állati tesztorganizmusok

A tanszéken protozoákkal dolgoztunk ki direkt kontakt tesztet talajra. Tesztorganizmusként *Tetrahymena piriformis* vagy *Colpoda steinii* állati egysejtű fajok használhatóak. Az állati egysejtűekkel való munka viszonylag egyszerű és gyors, az eredmény a környezeti kockázatbecslésben igen fontos trofikus szintet (állat) képvisel.

5.4 A talaj saját aktivitásán alapuló tesztek

A talaj biológiai állapotának jellemzésére mind a benne élő mikroorganizmusokat, mind pedig ezen mikroorganizmusok működését jelző enzimeket és egyéb biológiai paramétereket mérhetünk. A tanszéken kidolgoztunk egy módszert, mellyel szénhidrogént és más szerves szennyezőanyagokat bontó baktériumok számát (és jelenlétét) lehet meghatározni. Ez alapján a talaj bontó aktivitásának mértékére lehet következtetni.

A talaj állapota, aktivitása a talajlégzés intenzitásával is jellemezhető. A tanszéken két, légzésen alapuló módszert is kidolgoztunk. Az egyiknél oszlopreaktorba helyezük a vizsgálandó talajt és a termelt CO₂-ot mérjük titrálásos módszerrel. A másik kidolgozott módszer zárt palack teszt talajlégzés mérésére, amely az eredetileg BOI mérésre használt készülék adaptálása talajlégzés mérésére.

5.5 Egészséges talaj, mint tesztorganizmus

A mikrokozmosz tesztek egy speciális megoldása talajoknál, hogy garantált és állandó minőségű törzstalaj ökoszisztémáját tesszük ki a tesztelendő vegyi anyag különböző koncentrációinak és talaj enzimaktivitásainak, sejtszámának, fajeloszlásának, stb. változását vizsgáljuk a vegyi anyag növekvő koncentrációjának függvényében. A tanszéken kidolgozott teszttel a talaj nitrifikáló képességének toxikus hatásokra bekövetkező csökkenése mérhető.

5.6 Talajra való adaptálás és kidolgozás alatt álló interaktív tesztek

- Talajok toxicitásának mérése mikrokolorimetriás módszerrel
- Nematóda teszt: *Panagrellus redivivus* tesztorganizmussal
- Zárt palack teszt továbbfejlesztése
- *Vibrio fischeri* teszt továbbfejlesztése