

Szerves talajszennyező anyagok fázisok közötti megoszlása és biológiai hozzáférhetősége

Hajdu Csilla¹, Gruiz Katalin¹, Fenyvesi Éva²

¹Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék, 1111 Budapest Gellért tér 4.

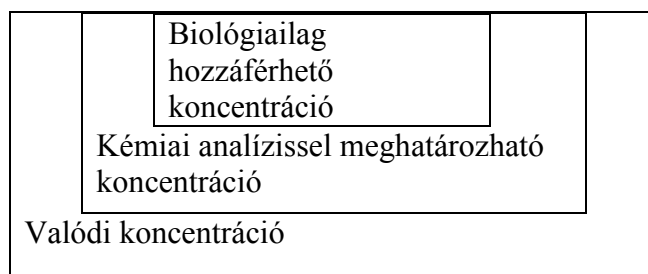
²CycloLab Ciklodextrin Kutató fejlesztő Laboratórium Kft, 1097 Budapest Illatos út 7.

Bevezető

A környezetünket szennyező vegyi anyagok biológiai hozzáférhetősége és a hozzáférhetőség környezeti kockázatra gyakorolt hatása olyan sokrétű probléma, melynek megoldása a környezetvédelemben rendkívüli jelentőséget kap. Ma még keveset tudunk a hozzáférhetőség és a kockázat közötti összefüggésekről.

A szennyezőanyagok valódi mennyisége, analitikai mérésekkel meghatározható, feltárható mennyisége, valamint az élő szervezetek számára hozzáférhető mennyisége eltér. Minél nagyobb ez az eltérés, annál inkább befolyásolja a kockázatcsökkentés lehetőségeit, módját és ami meghatározó lehet, a költségét. A költség hatékony kockázatcsökkentés lényege, hogy a szennyezőanyagok szintjét a kockázatos szint alá kell csökkenteni, a kockázatos szintet viszont a káros hatás határozza meg, ami pedig egyértelműen függ a biológiai hozzáférhetőségtől.

A kockázatfelmérés jósága és a kockázatmenedzsment sikere tehát alapvetően függ attól, hogy meg tudjuk-e becsülni, ki tudjuk-e mérni a szennyezőanyagok biológiailag hozzáférhető hányadát azokban a környezeti elemekben és fázisokban, ahová terjedésük során kerülnek és amelyeket az ember vagy az ökoszisztéma használ és azokban az élelmiszerekben, amelyeket fogyasztunk.



1. ábra: A biológiai, kémiai és valódi koncentráció viszonya

A kémiai analízissel meghatározható koncentráció elegendő lenne, hiszen a biológiailag hozzáférhető általában kisebb, azonban ez nem így van, az élő szervezetek homeosztázisban vannak, ami egy állandó anyag és információcserét jelent a környezettel egy viszonylagos egyensúlyban.

Esetleg kémiai analízissal nem vizsgálunk olyan szennyezőanyagokat, melyek jelenlétét nem gyanítjuk, noha káros hatásuk az élő szervezetekre érvényesül. Így egyáltalán nem vehetjük biztosra azt, hogy az ábrán feltüntetett arányok nem változnak. Ezen kívül fontos szerepe van az időbeliségnek is, ami az élő szervezetek számára kitüntetett szerepet kap, a kémiai feltárás során egy adott időbeni koncentrációt határozhatunk meg, egy ott élő organizmus szervezetébe folyamatosan bejutva ott felhalmozódhat, vagy ellenkezőleg az élőlény képes lehet akár távol tartani magától. Így a környezetbeni koncentráció többszörösétől a töredékéig terjedhet az ökoszisztémával reakcióba lépő szennyezőanyag mennyisége. Ezeknek a hatásoknak a figyelembe vétele biológiai rendszerek alkalmazása nélkül lehetetlen és rendkívül bonyolult lenne. Ez az oka annak, hogy a kockázat felmérésének elengedhetetlen eszközévé válnak az *ökotoxikológiai tesztek*.

A káros hatás szempontjából fontos momentum a szennyezőanyagok kémiai formája, mely a környezet függvényében (pH, redoxpotenciál, enzim-hatások) folyamatosan változhat, ezzel együtt a vegyi anyag hatása is megváltozik. Kémiai analízissal nem követhetők a vegyi anyagok közötti kölcsönhatások sem, vagyis az, hogy a több vegyi anyag hatása nem additív, hanem szinergizmuson vagy antagónizmuson alapuló anomáliák léteznek.

Különösen nagy hangsúlyt kapnak a kémiai analitikai eljárások és a hatáson alapuló mérések közötti eltérések olyan közegben, mint a talaj, ahol a kölcsönhatások, a matrixhatások, a talaj organominerális komplexével és biotájával potenciálisan kialakuló kölcsönhatások nagymértékben befolyásolják a kockázat nagyságát.

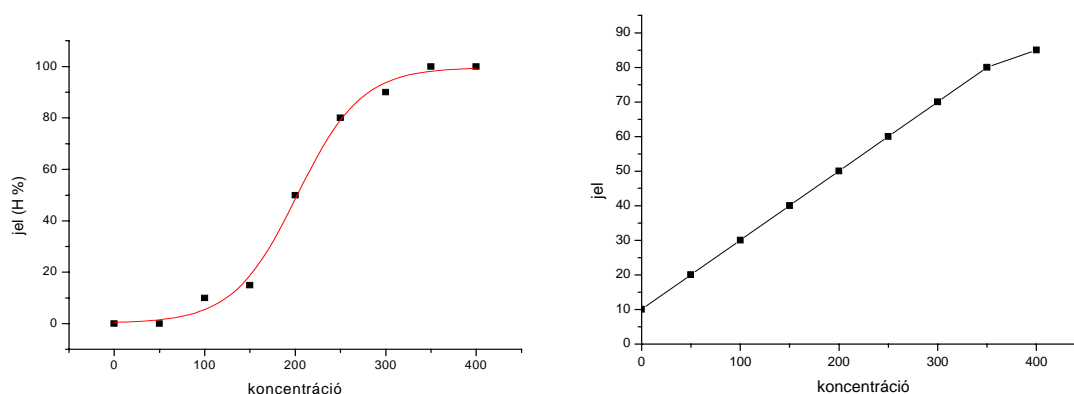
A munkám során a környezet szempontjából veszélyesnek tartott modellvegyületekkel mesterséges szennyezett talajokkal végeztem összehasonlító vizsgálatokat. Analitikai méréssel és különböző indikátor szervezetekkel teszteltem a talajokat. Így képviseli magát a kísérleteimben a kémiaileg meghatározható, és a biológiai szempontból fontos koncentráció. További célom, hogy a hozzáférhetőséget jól modellező előkezelési, illetve kivonási eljárást találjak szennyezett talajok analíziséhez. Olyan módszerre van szükség, mely nem becsüli alá, de túlságosan fölé sem a kockázatot, és állandó összefüggést ad a biológiai válasszal.

Direkt érintkeztetés és a biológiai válasz

A ma alkalmazott ökotoxikológiai tesztek szilárd mátrixból extraktum készítését írják elő, melyek desztillált vízzel, vagy valamilyen felületaktív anyag oldatával (DMSO) készülnek. Ezek a kimosódást jól modellezhetik ugyan, de a talaj élővilágára gyakorolt hatásra vonatkozóan nem ad információt.

A kivonat készítés továbbá elkerülhetetlen hígítással jár, emellett a szerves anyagok esetében az extraktumba jutás hatékonyságát a megoszlási hányados befolyásolja. Ezek figyelembe vételével sem adhatunk reális képet magának a talajnak a toxicitására ilyen módszerrel. Az analitikai mérések alkalmával oldószerekkel nyerjük ki a toxikus anyagot, majd egyszerű egyenes arányossági számítással következtetünk a talajban lévő koncentrációra. Ezt azért tehetjük, mert az analitikai mérésnél a jel-koncentráció összefüggés lineáris.

A toxikológiai tesztek görbéi nem ilyen egyszerűek, ha tízszeresen hígítunk, az nem jelenti azt, hogy az eredeti minta tízszer toxikusabb. A telítési görbe a hipotetikus receptor toxikus molekulával való telítődését ábrázolja, ezt bonyolítja a többféle expozíciós útvonal, több hipotetikus receptor, a sejtbe való bejutás, a hozzáférhetőség. A toxikológiai tesztek ezeknek a hatásoknak az eredőjét vizsgálja.

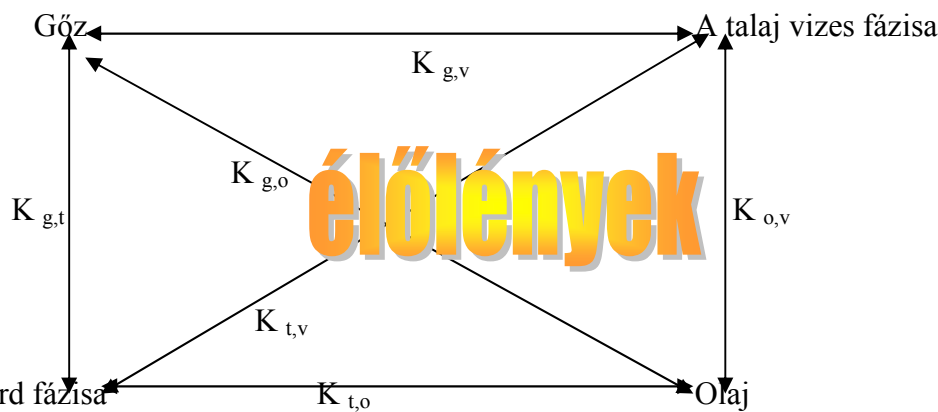


2. ábra: Ökotoxikológiai és analitikai mérés koncentráció-jel viszonya

Szennyezőanyagok sorsa a környezetben

Megoszlási hányadosok

Egy szennyezőanyag okozta veszély vizsgálatakor a környezeti elem összes szereplőjét vizsgálnunk kell, majd az azok közti kölcsönhatásokat, transzportfolyamatokat. Ekkor egy bonyolult, sok komponensű rendszer alakul ki, amelybe maga a veszélyeztetett élőlény is beletartozik, hiszen jelenlétével (gyökérsavak, detergensok, emésztőnedvek kiválasztása, mineralizáció, biodegradáció, akkumuláció) azt alakítja.



3. ábra: A talaj és a szennyezőanyag fázisainak megoszlása

A talaj esetében egy igen bonyolult háromfázisú rendszert (szilárd talajszemcse, talajvíz, talajlevegő) alkotnak. A szilárd fázist élő (biotikus) szervezetek és élettelen (abiotikus) anyagok alkotják. Utóbbiak lehetnek holt szerves (humusz), vagy szervetlen vegyületek. E fázisok összetétele és egymáshoz viszonyított aránya, a közöttük lévő megoszlások, transzportfolyamatok határoznak meg minden folyamatot a talajban (3. ábra). 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. Mérsékeli a különféle környezeti ártalmakat, mivel megköti a szerves szennyezőanyagokat és a toxikus fémeket, csökkentve ezzel azok hozzáférhetőségét és toxikus hatását.

Megoszlást befolyásoló tényezők

A szennyezőanyagra vonatkozó fizikai-kémiai tulajdonságok: molekulasúly, oktanol-víz megoszlási hányados, vízdékonyság, gőznyomás, forráspont ezek a tulajdonságok fogják meghatározni azt, hogy a vegyi anyag a környezeti elem mely fázisában milyen koncentrációban lesz jelen az egyensúlyi állapotban. Továbbá kérdéses, hogy hogyan fog alakulni az idő előre haladtával vagy ionképző anyagok esetében ismerni kell a megoszlási hányadosok pH függését, és azokat lehetőleg a környezet pH-jára kell korrigálni.

Így a vegyi anyagok a más-más környezetben eltérő fizikai-kémiai formában vannak jelen, mely eltérő hatással is jár, ennek a hatásnak a meghatározója a biológiai hozzáférhetőség. Az aktuális toxicitás tehát e hozzáférhetőségtől függ. A környezeti koncentráció előrejelzésénél a szennyezőanyagok hozzáférhető részének meghatározására lenne szükség, melyet az analitikai módszerek nem reprezentálnak az oldószeres, vizes kivonat készítésével vagy savas feltárással. A fizikai-kémiai tulajdonságok áttekintésével előzetes következtetéseket vonhatunk le a környezet

dinamikus folyamataiban való részvételre és a hozzáférhetőségre vonatkozóan, de nem tudhatjuk pontosan, hogy a kémiai kivonással alá vagy fölé becsülünk a hozzáférhető hányadnak.

Hozzáférhetőség modellezése

A kémiai kivonás a jelenleg alkalmazott módon nem modellezi megfelelően a szennyezőanyagok hozzáférhető, ható koncentrációját, a kísérleteimben olyan előkezeléseket alkalmaztam mesterségesen szennyezett talajokon, amelyek várhatóan megváltoztatják az oldószeres kivonás hatásfokát, melyek majd így jobban közelítik a ható koncentrációt. Ezeket a feltevéseket a későbbiekben a kémiai extrakció és ökotoxikológiai teszt összevetésével vizsgálom.

Emésztés

A talaj emberi szervezetbe kerülése után, a szennyezőanyagok részben vagy teljesen elhagyják a talaj-mátrixot az emésztés során. Biológiailag hozzáférhetőnek nevezhető a szennyezőanyag azon része, amelyet az emésztőnedvek elkülönítenek a mátrixtól. Később ez a mennyiség abszorbeálódhat; vagyis átjut az emésztőcsatorna falán a vér-, vagy nyirokáramba. Ezt követően a szennyezőanyagok biotranszformáción esnek át, vagy kiválasztódnak az epében és a májban. Általában kisebb mértékű abszorpciót és kisebb toxikus hatást figyeltek meg, amikor ugyanaz a szennyezés élelmiszer vagy oldat formájában kerül a szervezetbe. A különbség annak tulajdonítható, hogy az élelmiszerekkel együtt bevitt szennyezőanyag orális hozzáférhetősége kisebb.

Eddig számos ilyen modellt készítettek már, nehézfémek, és szerves szennyezők feltáródását vizsgálva. Ezek megegyeznek abban, hogy az emberi emésztőrendszer azon részét, ahol a veszélyes anyagok feltáródhatnak vagy hozzáférhetővé, toxikussá válhatnak 3 részre osztották: nyelés szakasza, szájüreg modellje; gyomor modellje; valamint a vékonybél szakasza [1] Az alkalmazott emésztési modelleknél specifikus egyszerűsítések megengedettek, azonban ezeknek, az elhanyagolásoknak a hatását vizsgálni kell, hogy az okozott lépés kihagyása milyen adatvesztést, torzítást okozhat. A szakirodalomban található még különböző felszívódási modellek is, melyek alkalmazása bonyolult és nehézkes amellet, hogy egy-két speciális esetre alkalmazhatóak.

A ciklodextrinek alkalmazása

A ciklodextrint felületaktív tulajdonsága miatt választottuk, a biodegradáció serkentésében már bizonyított[2]. A kis polaritású szerves szennyezőket a vízben oldott ciklodextrin képes apoláris üregébe zárni és átvinni a vizes fázisba. Így olyan perzisztens anyagok válhatnak eltávolíthatóvá, és biológiailag hasznosíthatóvá, amelyek egyébként a talaj oldhatatlan szerves fázisához kötődtek. In

situ, talajhoz adagolva 0,5 és 1 %-os koncentrációban transzformátorolaj és gázolajjal szennyezett talajban jelentősen növeli a bontás sebességét, és nem csak a lebontani kívánt szennyezőanyag, hanem egyéb tápanyagok is hozzáférhetővé válnak a mikroflóra számára, serkentve így a talaj kultúráját[3].

Biológiai hasznosíthatóság (bioavailability) modellezése

Adott talaj és szerves szennyező anyag esetén a kontaktidő szabja meg azt, hogy mennyire hozzáférhető biológiailag vagy kémiaailag az adott szennyező. Az utóbbi időben nagyobb hangsúlyt fektetnek arra, hogy a talaj szerves anyagához kötött anyagokat hogyan lehet felszabadítani és biológiailag hasznosíthatóvá tenni. A hasznosíthatóságot alapvetően két dolog határozza meg. A transzportfolyamat, amellyel a szennyező eljut a bontó sejtig, és a sejt által történő felvétel és átalakítás. Legtöbbször a transzportfolyamatok jelentik a limitáló tényezőt, azon belül is a talaj oldhatatlan szerves részéről való deszorpció ($\log K_{ow}$ nagy). Így annak ellenére, hogy jelen vannak a bontásra képes mikroorganizmusok, a szennyezőanyagok megmaradnak a talajban a remediálás hatékonyságát csökkentve.

A szennyeződések biológiailag hasznosítható frakciójának vizsgálatával Reid és munkatársai hosszú ideje foglalkoznak[4]. Legutóbb HPBCD vizes oldatának kioldásával modellezték a fenantrén hozzáférhetőségét, biológiai kioldhatóságát. Mesterségesen C14-es jelzésű fenantrénnel szennyeztek különböző típusú és szerves anyag tartalmú talajokat. A fenantrén jelenlétével járó egyéb szerves komponenseket toluollal helyettesítették, emellett intenzívebbé tette a talaj szerves anyag tartalmával való kontaktust. Tapasztalataik szerint a nagyobb szerves anyag tartalmú talajokból kevésbé extrahálható ki a fenantrén, továbbá a szennyeződés korának előre haladtával is jelentősen csökken a kinyerés.[5]

Biológiai és kémiai hozzáférhetőséget összehasonlító vizsgálatok

Mesterséges szennyezés

Barna erdőtalajt leszitált, légszáraz állapotban szennyeztem többféle koncentrációban, a kísérletek megkezdése előtt a légszáraz talajt csapvízzel nedvesítettem, majd újra kiszárítottam, ezzel a talaj szerves anyag tartalmába történő integrálódást akartam segíteni.

Előkezelés emésztőenzimekkel

Az emésztés kivitelezéséhez olyan reaktorra volt szükségem, amelyet folyamatos keverés mellett 37°C-on termosztálhatok és a palack légteréből el tudom távolítani az oxigént tartalmazó levegőt.

Ehhez a Deschler-féle gázmosó palackot találtam megfelelőnek. Az edényzetet a kísérlet megkezdése előtt N_2 gázzal átöblítettem, az emésztés folyamán, pedig a $37^\circ C$ -ot tartva mágneses keverővel szimuláltam a gyomor és a vékonybél perisztaltikus mozgását.

Elsőként az emésztő reaktorba bemértem a megfelelő szennyezőanyag mennyiséget vagy 2 gramm szennyezett, illetve szennyezetlen kontrol talajt, majd hozzámértem 100 ml sóoldatot, és 5 ml sertés pepszin tartalmú sósav oldatot. A pH-t beállítottam 1-re 1 mólos HCl oldattal, majd belehelyeztem a mágneses keverőt és belehelyeztem a levegőztető szarát és lezártam. Az emésztés első, pepszinnel történő szakasza egy órán át tartott, majd kivettem a termosztátból és 50 ml mintát vettem az emésztett oldatból és félretettem további mérésekre, tesztelésre. A maradék oldattal folytattam az emésztés második szakaszát, amelyhez sertés epe és hasnyál extraktum $NaHCO_3$ -os oldatát használtam, beállítottam a pH-t 7-re 1 mólos $NaHCO_3$ oldattal. A palackot lezártam és ismét átöblítettem a reaktor légterét N_2 gázzal. Ezután újabb 1 órán át folytattam az emésztést a $37^\circ C$ -os termosztátban folyamatos keverés mellett.

Anyagok

- 100 ml sertés pepszin oldat: 2,5 g sertés pepszin extraktum (Sigma 924 U/mg) 1,1 mólos HCl oldatban
- 1 l epe és hasnyál-extraktum: 2 g hasnyál-extraktum(Sigma), 12g epe extraktum (Sigma) 0,1 mólos $NaHCO_3$ oldatban
- 1 mólos $NaHCO_3$ oldat pH beállításhoz
- 1 mólos HCl oldat pH beállításhoz
- 1 l sóoldat: 120 mmol NaCl 5 mmol KCl

Előkezelés ciklodextrinnel

A vizsgálatokhoz két, jó vízdoldékonyságú ciklodextrinnel végeztem előkísérleteket. Azt vizsgáltam, hogy a random metilezett β -ciklodextrin (RAMEB) és hidroxipropil- β -ciklodextrin (HPBCD) közül melyik befolyásolja jobban a fenantrén vízdoldhatóságát. Mindkét származékot a Wacker Chemie (München, Németország) gyártja. A komplexképzés oldhatóságfokozó hatását a modell talaj-szennyezőanyagként alkalmazott fenantrén (Aldrich) vizes RAMEB és HPBCD oldatban vizsgáltam. A komplex képzés során vízdoldható komplexek keletkeztek. A fenantrén oldott mennyiségét a feleslegben adott és fel nem oldódott hatóanyagtól elkülönítve megfelelő hígítás után 50%-os etanolban mértük fotometriásan ($\lambda_{max} = 252 \text{ nm}$).

Ezután az anyagok $\log K_{ow}$ -jére gyakorolt hatást tanulmányoztam. Poláris fázisként vizes és ciklodextrines oldatokat használva vizsgáltuk a fenantrén megoszlását a szerves és szervesetlen fázis

között, annak érdekében, hogy megtudjuk, befolyásolja-e majd a talaj szerves anyag tartalmához való kötődést a ciklodextrin jelenléte.

A ciklodextrin vízoldhatóság és az n-oktanol-víz megoszlási hányados módosító hatásának vizsgálata alapján a random-metilezett-B-ciklodextrint választottuk a további kísérletekhez. A koncentrációra vonatkozóan irodalmi adatokat vettünk alapul[6], ezért 1%-os ciklodextrin adagolást alkalmaztam.

Ezek alapján az alkalmazott előkezelések után az 1. táblázat foglalja össze a készített mintákat, melyeket a későbbiekben kémiai és ökotoxikológiai analízisnek vetek alá.

1. táblázat: Fenantrénnel szennyezett talajok előkezelései

Szennyezett talaj		
Emésztési modell	I. szakasz: kezelés a gyomor enzimeivel	Szennyezett talaj Tiszta szennyezőanyag
	II. szakasz: kezelés epével és hasnyállal	Szennyezett talaj Tiszta szennyezőanyag
Szennyezett, 1% ciklodextrinnel kezelt talaj		

Előkészítés a kémiai analízishez – kémiai hozzáférhetőség vizsgálata

Az analitikai mérések egyik legfontosabb lépése a minta előkészítése, mely itt a szennyezőanyag oldószeres kivonásából áll. A kivonáshoz olyan oldószert kell keresnünk, mely visszanyerése jó, ugyanakkor jól reprezentálják az ökoszisztéma számára hozzáférhető toxikus anyagok mennyiségét. Erre azonban nem találtam utalásokat a szakirodalomban, csak a visszanyerés hatékonyságára, emiatt analitikai mérésekhez kétféle extraktumot készítettem: diklórmétánnal és n-hexán aceton 2:1 arányú keverékével.

Folyadékminták esetében

A folyadék halmazállapotú minták extrakcióját rázótolcsérben végeztem 3 szakaszban, vagyis 3-szor kb. ugyanannyi mennyiségű oldószerral elegyíttem az oldat 10 ml-ét, majd az oldószert összegyűjtöttem teflontetős Erlenmeyer-lombikba, és vízmentes NaSO₄- hozzáadásával a maradék vizet eltávolítottam. Az összegyűjtött, leszártított extraktumot gömblombikba szűrtem és folyamatos desztillálóval elpárologtattam az oldószert. A bepárolt extraktumot ezután kimosva a gömblombikot 10, illetve 25 ml-re egészítettem ki.

Talajminták esetében

5 g talajt és kb. 5 g vízmentes Na₂SO₄-et 10 ml 2:1 arányú hexán-acetonnal öntöttem fel, 10 percig rázattam ultrahangos fürdőben. Ezután a talajról szűrőpapíron át leöntöttem az oldószert extraktumos

üvegbe és újabb 10 ml oldószert öntöttem hozzá, ismét 10 percet rázattam ultrahangban, majd szűrőpapíron át az előbbi extraktumhoz öntöttem.

A kivonatokat ezután lángionizációs detektorral felszerelt gázkromatográfival vizsgáltuk.

Ökotoxikológiai tesztek - biológiai hozzáférhetőség vizsgálata

Talajjal történő interakció, tenzidek, gyökérsavak, huminsavak hatására megváltozó biológiai hozzáférhetőséget teljes mintával végeztem, direkt érintkeztetéssel.

***Vibrio fischeri* teszt**

A mérést a DIN 38412 szabvány módosításával végeztem. A *Vibrio fischeri* fakultatív anaerob, pálcika alakú és poláros ostorral rendelkező baktérium. Tengeri mikroorganizmus, ezért halofil. Jellemző tulajdonsága, a biolumineszkálás, vagyis az anyagcsereje során fényt képes kibocsátani, ennek intenzitása fényáramméréssel érzékelhető. Ha toxikus anyag kerül a rendszerbe a mikroba pusztulása miatt a fényintenzitás csökken. Tengeri élőlények révén életfolyamataikat, így a lumineszcenciát is befolyásolja a sókoncentráció. A *Vibrio fischeri*-nél a szaporodás és a lumineszcencia 2% NaCl jelenlétében optimális.

Méréseimhez a tesztorganizmus jellemző tulajdonságát, a lumineszkáló képességét használtam fel.

A vizsgálathoz szükséges mikroba szaporítását 100 cm³-es Erlenmeyer-lombikba 20 cm³ táptalajban végezzük, amelybe hűtőben fenntartott tenyészetből 1 cm³-t oltunk át. Az így elkészített inokulumot 24 órán át rázatjuk 28°C hőmérsékleten. Az így elkészített inokulum beütésszámát a mérés előtt 15-szörös hígításban mérjük.

A lumineszcencia mérésére LUMAC Biocounter M1500P. luminométert használtam. Első lépésként ellenőrizni kell a baktériumszuszpenzió érzékenységet, melyet standard Cu-sor gátlásának mérésével ellenőrzünk. A Cu standardok koncentrációja 25, 50, 100, 200, 400 ppm. A felhasznált Cu-só CuSO₄·5H₂O. A standardok hígításához 2%-os NaCl oldatot használunk. A mérés kontrolljaként nehézfémeket nem tartalmazó 2%-os NaCl oldatot használunk.

A méréshez a mintatartóba 200-200 µl inokulumot mértem, majd megmértem ezek lumineszcencia kibocsátását (I₀). Ezután hozzámértem 50-50 µl-t az előzetesen elkészített minták hígításaiból és azonnal megmértem (I₁) a fényintenzitás gátlást, ezzel kizárólag ki a mátrix okozta fényintenzitás gátlást. A minta toxicitása okozta gátlást 30 perc múlva mértem (I₃₀)

A minták hígítási sorához elsőként 2 ml 2 %-os NaCl oldattal hígítottam 2 g talajmintát, illetve 2 ml emésztett mintát, majd ebből a felkevert szuszpenzióból készítettem öttagú felező hígítási sort.

***Azomonas agilis* teszt**

A teszten az *Azomonas agilis* tesztorganizmus dehidrogenáz enzimaktivitásátmérjük. Ha valamilyen stressz éri a sejtet, akkor az elektrontranszport rendszer megsérülhet. Az elektrontranszportlánc első szakaszának lépéseit a dehidrogenáz enzim katalizálja. Alternatív elektrontrakeptorként TTC (2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid) szolgál, mely az elektrontranszport zavartalan működése esetén redukálódik és piros színű trifenil-formazanná alakul. A piros szín megjelenése mikrobiális tevékenységre utal. Toxikus anyagok jelenlétében a dehidrogenáz enzimaktivitás gátolt, ezért a TTC redukciója nem történik meg, vagyis piros szín nem jelenik meg.

A méréshez legalább öttagú, kétszeres léptékű hígítási sort készítünk: 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312 g bemért mennyiségekkel, majd áramló gőzben sterilezzük, a további munkát steril átotlófülkében ajánlott végezni, mert ha más mikróbák kerülnek a tesztoldatba, azok dehidrogenáz aktivitása meghamisítja az eredményt. Idegen mikroorganizmusok gátolják az *Azomonas agilist*.

A 48 órán keresztül, 25 °C-on rázatott baktériumszuszpenzióból 5 ml-hez 100 ml sterilizett Fjodorov táptalajt és 1 ml TTC oldatot adunk. Az elkészített keverékből a kémcsövekbe 2-2 ml-t pipetázunk, homogenizáljuk (Vortex segítségével), lezárjuk, majd 25°C-os termosztátba teszük és fénytől elzárjuk.

Referenciaként réz oldat hígítási sorozatot készítünk tízszeres hígítási faktorról, azaz 400; 40; 4; 0,4; és 0,04 ppm koncentrációjú oldatokkal. Az étékelés 72 óra múlva végezhető.

A piros szín megjelenésétől függően 100, 50 és 0 %-os gátlást állapítottam meg:

100%-os, teljes gátlás – piros szín teljes hiánya

50%-os, szaporodás gátlás – enyhe piros szín, vagy kicsi piros folt

0%-os gátlás, vagyis serkentés, szaporodás – intenzív piros szín az egész szuszpenzióban

***Folsomia candida* teszt**

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 teszt módszer (ISO/TC 190 SC4 WG2).

A *Folsomia candida* faj a Collembolák (ugróvillások) rendjébe tartozik, ősi rovar. Apró (max. 3-4 mm hosszú) fehér állatkák, a hasi oldalukon ugróvillájuk van, amit ha 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 *epimorfózissal* (kifejléssel) szaporodnak. Ha nagyon alacsony a nedvességtartalom, a peték kiszáradnak. Megfelelő nedvességtartalmú, 20°C-os környezetben a peték 10 - 15 nap alatt kelnek ki, a kikelt állatok újabb 10 - 15 nap alatt válnak ivaréretté.

A faj akut és krónikus teszthez is használható, az *akut teszt* 5-10 napig tart, ami azt veszi figyelembe, hogy hány százalékban maradnak meg az állatok a vizsgált mintán. Ezzel a teszttel lehet a minta hígításából az EC₂₀-at és EC₅₀-et vagy ED₂₀-at és ED₅₀-et meghatározni. A másik a négy hétig tartó *krónikus teszt*. Ez a teszt tulajdonképpen egy reprodukció vizsgálat, mivel a megmaradt állatok száma mellett figyelembe veszi azt is, hogy milyen mértékben szaporodtak.

A Collembolák természetes környezetükben szerves törmelékeket, gombahifákat esznek, ami labor körülmények között a gipszlap felszínére szórt szárított sütőélesztővel helyettesítő.

A vizsgálathoz azonos korú (14 napos) állatkákat kell felhasználni, ezért szükséges a szinkron populáció létrehozása. Ehhez egy a fenti módon elkészített, megnedvesített gipszlapra 50 db állatot kell helyezni, amelyek 2-3 napon belül lepetéznek. A peték kb. 2 hét (10-12 nap) múlva kelnek ki (ilyenkor egész apró állatkák is megfigyelhetők, ekkor távolítandók el az idősebbek a lapról). Az állatok sérülésmentes áthelyezéséhez egy speciális, saját fejlesztésű edénykét használunk.

A teszthez 20-20 g légszáraz vizsgálandó talaj mintát mérünk be 370 ml-es befőttes üvegekbe. A mintákat 5-5 ml vízzel megnedvesítjük és 2-2 mg élesztőt szórunk a tetejükre. Az üvegekbe 10-10 db állatkát juttatunk a fent leírt átrakóval. A teszt edényeket 7 napig sötét, 20-25°C-os helyen tartjuk, majd kiértékeljük. Ha a talajminták toxikusnak bizonyultak felező hígítási sort készítettem, a hígításhoz OECD standard talajt használtam.

Az egy hét letelte után a talajmintákat tartalmazó befőttesüvegeket felöntöttem vízzel és üvegbottal megkevergettem, majd vártam míg az élő Collembolák a felszínre úsznak, az állatokat megfigyeltem, hogy élnek-e, mert gyakran az elpusztult állat is a felszínre kerül. Megszámoltam az élő állatokat, amely alapján kiszámoltam a pusztulási százalékot.

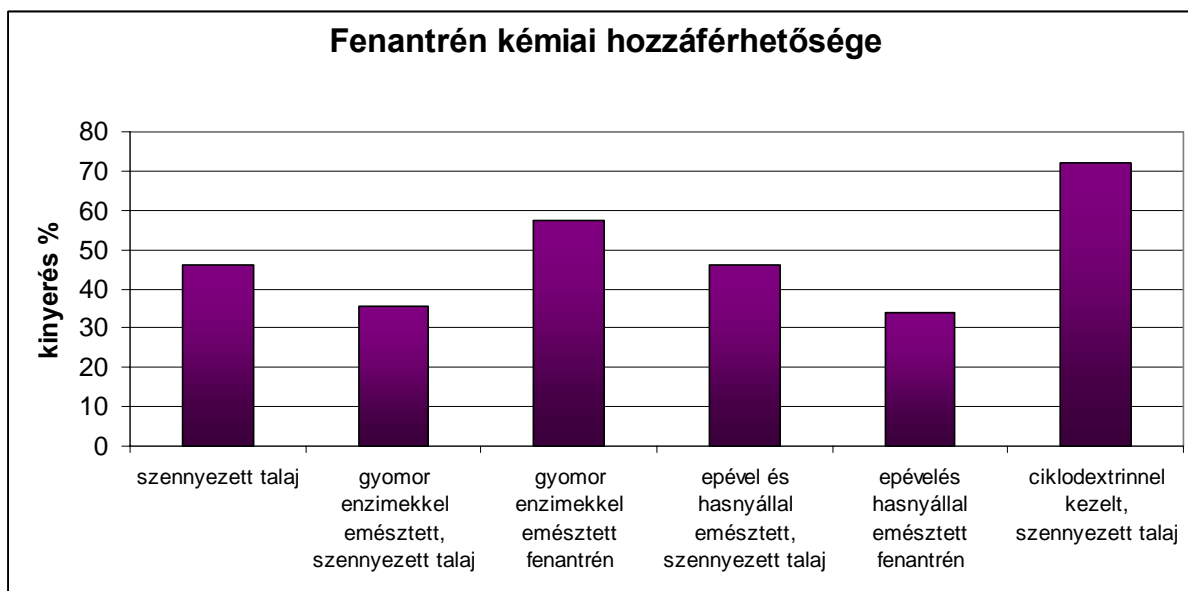
Kísérleti eredmények

Azt vizsgáltuk, hogy az emésztéses és a ciklodextrines előkezelés mennyiben járul hozzá egy szénhidrogénnel szennyezett talaj akut toxicitásához, és a kezelések mennyire módosítják a hatását.

Fenantrén hozzáférhetősége oldószerek számára

A kémiai hozzáférhetőség vizsgálatához készített extraktumokat gázkromatográfiásan elemeztük, majd az eredményekből kinyerési százalékokat számítottam, mivel a kétféle oldószeres kivonás között szignifikáns különbség nem volt, ezért ezeket átlagoltam és a 4. ábrán összefoglaltam.

A talajjal együtt és talaj nélküli emésztések modellezésével nemcsak az egyes emésztési szakaszokban történő változásokat követhetjük nyomon, hanem a talaj pufferoló hatását is megfigyelhetjük. Az emésztés első szakaszában a talaj szerves anyag tartalma nem táródik fel, mert itt a szennyezett talaj kinyerése kisebb, ez azzal magyarázható, hogy a gyomorban alacsony pH van ugyan, de felületaktív anyagok hiányában nem növekszik a hozzáférhetőség. Megfordul a helyzet az emésztés II. szakasza hatására, ahol már nemcsak a felületaktív epesavakkal kell számolnunk, hanem a bomlással is. A ciklodextrines kezelés hatására pedig megnőtt az oldószerral kinyerhető fenantrén mennyisége, ami a ciklodextrin felületaktív tulajdonságának köszönhető.



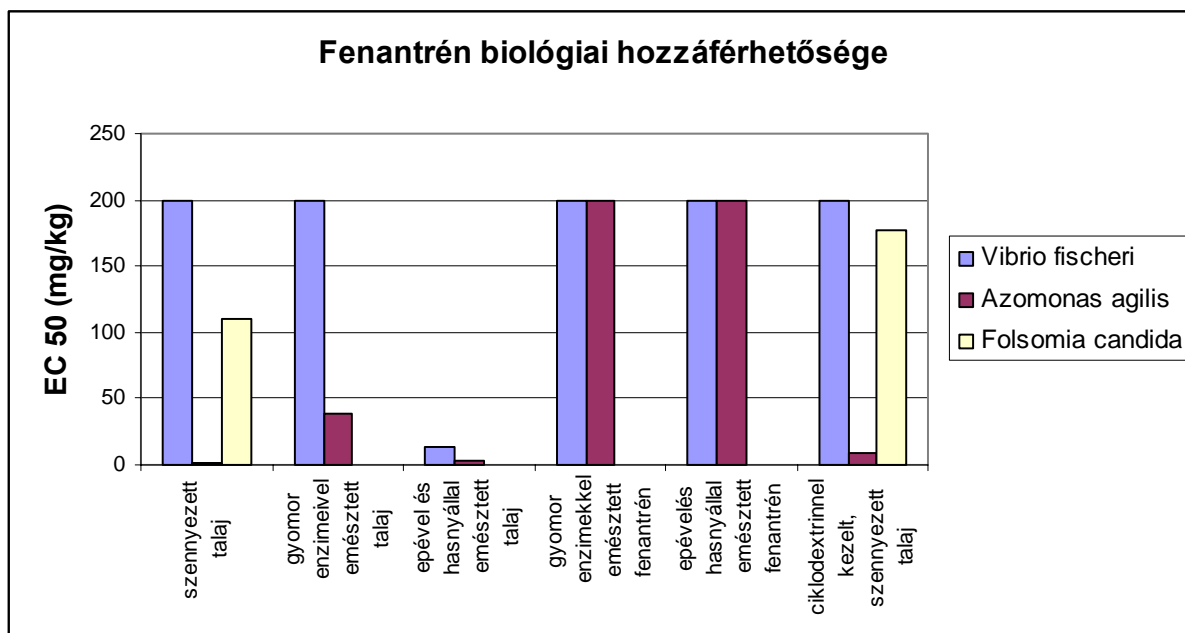
4. ábra: Fenantrén kinyerési hatékonysága különböző előkezelések hatására

2. táblázat: Fenantrén kinyerésének hatékonysága

	kinyerés hatékonysága (%)
kezeletlen	46,15
gyomor enzimekkel emésztett, szennyezett talaj	35,75
gyomor enzimekkel emésztett fenantrén	57,5
epével és hasnyájjal emésztett, szennyezett talaj	46,25
epévelés hasnyájjal emésztett fenantrén	34,05
ciklodextrinnel kezelt, szennyezett talaj	72,25

Fenantrén hozzáférhetősége tesztorganizmusok számára

A fenantrén egy nagy molekulájú, apoláros PAH vegyület, melynek karcinogén, mutagén hatása van. A kezelések hatására várhatóan átkerül a fenantrén egy része vizes fázisba, ezáltal biológiai hozzáférhetősége nő, melyet jelen esetben akut teszttel vizsgálók.



5. ábra: Különböző tesztorganizmusokkal megállapított EC50 értékek

3. ábra: Különböző tesztorganizmusokkal megállapított EC50 értékek

tesztorganizmus	szennyezett talaj	emésztés gyomor enzimekkel		emésztés epével és hasnyállal		kezelés ciklodextrinnel
		talaj mátrixban	csak szennyezőanyag	talaj mátrixban	csak szennyezőanyag	
<i>Vibrio fischeri</i>	>200	>200	>200	13,1	>200	>200
<i>Azomonas agilis</i>	2	>200	38,1	2,8	>200	9,5
<i>Folsomia candida</i>	110	-	-	-	-	176,6

Az 5. ábrán az általam használt tesztorganizmusokkal mért EC50 értékeket tüntettem fel. Az EC (hatásos koncentráció) érték minnél kisebb, annál toxikusabb a szennyezőanyag, ebben az esetben a toxikusság mellett azt is jelenti, hogy jobban hozzáférhető az adott tesztorganizmus számára.

Emellett figyelembe kell vennünk, hogy ezeknek a tesztorganizmusoknak az érzékenysége eltérő. Ennek tükrében a következtetések:

- a *Vibrio fischeri* nagy EC értékei arra utalnak, hogy ez a tesztorganizmus a fenantrénre nem érzékeny, csak az epe és hasnyál által emésztett fenantrénes talajra volt érzékeny, ez toxikus melléktermék jelenlétére utal.

- az *Azomonas agilis* érzékenyen reagált mind a fenantrénre mind az epe és hasnyál által emésztett szennyezett talajra. Tehát ez a tesztorganizmus egyaránt jelzi a toxikus melléktermék és a fenantrén jelenlétét is.

- a *Folsomia candida* teszt kivitelezése miatt csak a szilárd talaj tesztelésére alkalmas, emiatt csak a szennyezett talajt és a ciklodextrinnel kezelt talajt teszteltem ezzel, mindenképpen alátámasztotta az *Azomonas agilissel* mért eredményt, mely szerint a ciklodextrin csökkentette a toxicitást

Biológiai és kémiai hozzáférhetőség összevetése

A szennyezett, kezeletlen talajhoz képest jelentős kinyerés növekedést okozott a ciklodextrin, ám a többi előkezelés rontotta az oldószeres kivonás hatásfokát. A toxikológiai tesztek azonban kimutatták, hogy bár a fenantrén kisebb mennyiségben van jelen a II. szakaszban emésztett mintákban mégis kockázatot jelent toxikusságával. Az *Azomonas agilis* és a *Vibrio fischerivel* végzett tesztek a fenantrénnél toxikusabb melléktermék(ek) jelenlétét mutatják már akut teszttel.

Emellett érdekes eredményt hozott a ciklodextrines kezelés, mely komplexképzésével egy részről javította a kivonás hatékonyságát, ennek ellenére csökkent a toxicitás (a bezárt molekula nem érzékelhető az élő szervezetek számára. Ez arra utal, hogy az analitikai mérések kizárólagos alkalmazása nemcsak figyelmen kívül hagy bizonyos lehetőségeket, hanem az oldószeres kivonással kapott eredménnyel torz környezeti kockázatot becsülhetünk meg.

Az eredményekből látszik, hogy csupán oldószeres kivonás és analitikai mérés a szennyezőanyag koncentrációjának megállapításával nem ad választ arra, hogy az mekkora veszélyt is jelent az ökoszisztémára vagy az emberre, viszont ha az ökotoxikológiai teszttel együtt alkalmazzuk egy költségkímélőbb, realisabb és megbízhatóbb kockázatbecslést készíthetünk.

Irodalom

- 1 Xiang-Yu Tang, Lily Tang, Yong-Guan Zhu, Bao-Shan Xin, Jing Duan and Ming-Hui Zheng, 2006. Assessment of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing using an in vitro test. Environmental Pollution, 140, (2), 279-285
- 2 Gruiz, Molnár, 1999 Ciklodextrinek hasznosítása szennyezett talajok kezelésében
- 3 Molnár, Fenyvesi, Gruiz, Horváth, Szejtli 2000, Bioremediation using RAMEB Proc. 10th International Symposium
- 4 Reid, Jones, Semple, 2005. Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction Environmental Pollution, 2005
- 5 Cuypers, Pancras, Grotenhuis, Rulkens 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. Chemosphere, 46, (8), 1235-1245
- 6 Fenyvesi, 1999. CDs for Environmental Problems Part II. Decontamination of soil and ground-water. Cyclodextrin News, 13, 67-70