

Európa itt épül



GVOP-3.1.1-2004-05-0257/3.0

LOKKOCK

HELYSPECIFIKUS KOCKÁZATFELMÉRÉST TÁMOGATÓ ÚJ TALAJVIZSGÁLATI MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA

RÉSZLETES SZAKMAI BESZÁMOLÓ

I. Munkaszakasz: 2005.01.01 – 2005.12.31.

Koordinátor szervezet:

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (BME)

Konzorciumi tagok:

- 1. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (BME)**
- 2. MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet (TAKI)**
- 3. Cyclolab, Cyclodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft. (CYL)**

Projektvezető:

Dr. Gruiz Katalin

Készítették:

Dr. Gruiz Katalin
Atkári Ágota
Auerbach Rita
Bagi Andrea
Fehérné Tolner Mária
Feigl Viktória
Kálmán Judit
Leitgib Laura
Molnár Mónika
Nagy Noémi
Sipter Emese
Szakács Tünde
Udvarnagyi Eszter Dorottya

Dr. Fenyvesi Éva
Dr. Sente Lajos
Csabai Péterné
Kolbe Ilona
Szaniszló Nikoletta
Szemán Julianna

Dr. Murányi Attila
Oldal Bálint



Tartalom

HELYSPECIFIKUS KOCKÁZATFELMÉRÉST TÁMOGATÓ ÚJ TALAJVIZSGÁLATI MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA	0
Az 1. munkaszakasz tervezett feladatai	3
Az I. munkaszakaszban elért eredmények bemutatása	4
1.1. Információgyűjtés	5
1.2. Kísérleti munka, módszerfejlesztés	5
1.2.1. Fizikai-kémiai módszerek	5
1.2.1.1. Szerves szennyezőanyagok és komponensek műszeres kémiai analízise (gázkromatográfia)	5
1.2.1.2. Oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow}) meghatározásának kidolgozása, ciklodextrinek megoszlásra gyakorolt hatásának vizsgálata	6
1.2.1.3. Talaj-víz megoszlási hányadosok (K_d) meghatározása különböző típusú talajokra egyes szerves szennyezőanyag komponensekre és tipikus talajszennyező szénhidrogénkeverékekre, a különféle ciklodextrinek hatása a megoszlásra	7
1.2.1.4. A ciklodextrinnel extrahálható szennyezőanyag mennyisége és a biodegradálhatóság közötti összefüggés vizsgálata	8
1.2.1.5. Szennyezett talajbank összeállítása	9
1.2.1.6. Összes és mobilizálható nehézfém-tartalom meghatározása különböző kémiai módszerekkel A kémiai mobilizáció kockázata talajokban	9
1.2.2. Biológiai és géntechnikai módszerek	12
1.2.2.1. ATP mennyiség meghatározása talajban lumineszcencián alapuló eljárással	12
1.2.2.2. Fluorescens in situ hibridizáció (FISH) talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározására	13
1.2.2.3. Növényakkumulációs teszt tenyészedényes kísérletekkel (BCF meghatározása)	15
1.2.3. Mikrokozmosz teszt toxikus fémekkel szennyezett talajok stabilizációjára	16
1.2.4. Ökotoxikológiai és géntoxikológiai módszerek szennyezett talajok tesztelésére	18
1.2.4.1. Nitrifikációs gyors teszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére	18
1.2.4.2. <i>Tetrahymena pyriformis</i> szaporodásgátlási teszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére	19
1.2.4.3. Nematoda (<i>Panagrellus redivivus</i>) mortalitási teszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére	20
1.2.4.4. Ames-teszt szennyezett talajok mutagén hatásának jellemzésére	21
1.2.5. Laboratóriumi mikrokozmoszok	23
1.3. Laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek tervei a kidolgozott módszerek alkalmazására	23
MELLÉKLETEK	24
1. A kockázatfelmérés folyamatábrája, a területspecifikus kockázatfelmérést támogató mérések	25
2. Dízelolajjal szennyezett talajok extraktumainak gázkromatográfiás vizsgálata	26
3. K_{ow} meghatározása, ciklodextrinek hatása a megoszlásra	27
4. Extrakció különféle vizes ciklodextrin oldatokkal	30
5. A kémiai mobilizáció kockázata talajokban	31
6. FISH talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározására	35
7. Toxikus fémek növényakkumulációja: bioakkumulációs teszt megalapozása	37
8. Nitrifikációs gyors teszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére	39
9. <i>Tetrahymena pyriformis</i> szaporodásgátlási teszt szennyezett talajokra	41

AZ 1. MUNKASZAKASZ TERVEZETT FELADATAI

1. Munkaszakasz célkitűzései

1.1. Információgyűjtés

1.2. Módszerfejlesztések: előkísérletek és konkrét módszerek kidolgozása

1.3. Laboratóriumi kísérletek tervezése a módszerek alkalmazására.

Az 1. munkaszakaszban elvégzendő feladatok/munka leírása:

1.1. Irodalmi adatok feldolgozása és értékelése a módszerek kidolgozásához, információgyűjtés

1.2. Módszerfejlesztés: előkísérletek, módszerek kidolgozása

1.2.1. Biológiai és ökotoxikológiai módszerek fejlesztése

Biológiai és géntechnikai módszerek kidolgozása a talaj ökoszisztéma jellemzésére: ATP mennyiség mérése talajban lumineszcencián alapuló eljárással, fluorescens *in situ* hibridizáció talaj-mikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározására (FISH), direkt kontakt toxikológiai tesztek fejlesztése talajra, nitrifikációs teszt alkalmazása talajtoxicitás vizsgálatára. *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlási és *Nematoda panagrellus* redivivus mortalitási tesztek állati tesztorganizmusokkal, növényi bioakkumulációs tesztek, gyorsított a biokoncentrációs faktor (BCF) meghatározására.

1.2.2. Fizikai-kémiai módszerek fejlesztése

Szerves szennyezőanyagok extrakciója talajból és műszeres kémiai analízise (gázkromatográfia GC-FID), módszerfejlesztés oktanol-víz megoszlási hányados (Kow) meghatározásának kidolgozása egyes szerves szennyezőanyag komponensekre és tipikus talajszennyező szénhidrogén keverékekre, a különféle ciklodextrinek hatása a megoszlásra, talaj-víz megoszlási hányadosok (Ksw) meghatározása különböző típusú talajokra egyes szerves szennyezőanyag komponensekre és tipikus talajszennyező szénhidrogénkeverékekre, a különféle ciklodextrinek hatása a megoszlásra, a biodegradálható frakció extrakciója különféle vizes ciklodextrin oldatokkal, a ciklodextrinnel extrahálható szennyezőanyag mennyisége és a biodegradálhatóság közötti összefüggés vizsgálata.

1.2.3. Összes és mobilizálható nehézfém-tartalom meghatározása különböző kémiai módszerekkel, módszerfejlesztés

Toxikus fémek talaj-víz megoszlási hányadosának (Kp) meghatározása, a bioakkumulációs tesztek talaj- és növénymintáinak kémiai analízise: nehézfém-tartalom meghatározása

1.2.4. Az előkísérletek eredményeinek értékelése, módszertan kidolgozása

1.3. A módszerek alkalmazására irányuló laboratóriumi kísérletek tervezése

AZ I. MUNKASZAKASZBAN ELÉRT EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

A környezetirányítás egyik legnagyobb feladatköre a környezetbe kikerülő vegyi anyagok kockázatának menedzsmentje. A területspecifikus kockázatfelmérés célja, annak megállapítása, hogy egy konkrét területen az előrejelezhető szennyezőanyag-koncentráció kisebb vagy nagyobb-e a károsan még nem ható koncentrációknál, vagyis, hogy elfogadható kockázatot jelent-e az emberre illetve az ökoszisztémára¹.

A modern környezetmenedzsment eszköztárában ma még kevés az olyan megbízható, verifikált vizsgálati módszer, amely a vegyi anyagok helyszínspecifikus kockázatának felméréséhez szükséges jellemzők meghatározására alkalmas. Ezt a hiányt igyekszik pótolni a LOKKOCK című kutatási projekt. A projekt célja a helyszínspecifikus kockázat megítéléséhez nélkülözhetetlen, de ma még hiányzó módszerek azonosítása, fejlesztése. A metodikák kidolgozásánál és szabványosításánál is fontosabb annak az algoritmusnak a kidolgozása, mely egyértelműen megadja, hogy milyen problémára milyen vizsgálati módszerrel milyen válasz nyerhető. A LOKKOCK projektben előkészítjük ezt a munkát, és a kifejlesztett módszereket a felhasználhatóság, a környezetmenedzsmentben elfoglalt hely és cél szerint is jellemezni fogjuk.

Kutatásaink célja tehát olyan új talajvizsgálati módszerek kidolgozása, amelyek alkalmasak a szennyezőanyagok fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságainak jellemzésére, felhasználhatóak a szennyezőanyagok ökológiai hatásának, helyspecifikus kockázatának mérésére, előrejelzésére.

Alapvetően háromféle egymást kiegészítő vizsgálati metodikát fejlesztünk és alkalmazunk:

1. Fiziko-kémiai módszerek a nehézfémek és a szerves szennyezőanyagok mennyiségi és minőségi meghatározására, megoszlásának, transzportjának jellemzésére,
2. Az ökoszisztéma tagjainak minőségi és mennyiségi jellemzése biológiai és géntechnikai eljárásokkal,
3. A szennyezett környezeti minta hatásának mérése szilárd fázisú környezeti mintákra kidolgozott interaktív (direkt kontakt) környezettoxikológiai ill. géntoxikológiai tesztekkel.

Az integrált metodikával kapott koncentráció és hatás eredményekből meghatározható a kvantitatív környezeti kockázat, melynek időbeli változása a kockázati profil, melynek felvétele a szennyezett területek menedzsmentje során szükséges döntések közvetlen alapját képezheti.

Az áttekinthetőség kedvéért a fejlesztés alatt álló vagy már kifejlesztett módszereket a kockázatfelmérés két oldalának megfelelően két csoportra osztjuk:

1. a szennyezőanyag terjedésében, a szennyezőanyag környezeti koncentrációjának kialakulásában szerepet játszó paraméterek meghatározása méréssel és számítással.
2. a szennyezőanyag hatásának meghatározását szolgáló mérési és számítási módszerek.

Az **1. számú melléklet** mutatja a kockázatfelmérés folyamatábráját, és a két oldal jellemzését, meghatározását támogató módszereket.

Ezt a két oldalt a kockázatfelmérésben, vagyis a megszerzett információk és megmért jellemző paraméterek kockázatértékelésben való felhasználására alkalmas módszerek (helyszínspecifikus kockázatfelmérési módszerek, helyszínspecifikus kockázati modell, stb.) bemutatása és fejlesztése fogja össze ebben a pályázatban. A módszerek alkalmazhatóságát, verifikálását konkrét helyszíneken való alkalmazásuk során vizsgáljuk és értékeljük.

A támogatási szerződést 2005. 06. 16-i dátummal írtuk alá. 2005. áprilisában kezdtük a munkát.

Az első szakaszra vállalt valamennyi feladatot teljesítettük, és az alábbiakban részletesen bemutatjuk. Első részletes szakmai jelentésünkben a fejlesztendő területekről adunk egyenként áttekintést és ismertetjük a kifejlesztett módszerek alapjait és a konkrét fejlesztési munkát.

Kutatási munkánk során az egyes területekről külön tanulmányokat készítettünk, ezeket a BME MGKT Tanszékén (koordinátor szervezet) archiváltuk. Az elkészült tanulmányok anyagait feldolgoztuk ebben a szakmai beszámolóban, tételesen a **10. számú mellékletben** soroljuk fel őket.

¹ Gruiz, K.; Horváth, B. és Molnár, M. (2001) Környezettoxikológia. Műegyetemi Kiadó, Budapest

1.1. INFORMÁCIÓGYŰJTÉS

1.1.1. Áttekintettük a szennyezett területek felmérésében és monitoringjában, valamint a kockázaton alapuló környezetmenedzsmentben és az ahhoz kapcsolódó döntéstámogató eszközrendszerben alkalmazandó integrált módszeregyüttes a TalajTesztelő Triád (TTT) jellemzőit, szükségességét. A tanulmány bemutatja a TTT elemeit, a kockázatfelmérésben szerepet játszó környezettoxikológiai módszereket és szerepüket, valamint ismerteti a Triád jellemző alkalmazásait.

1.1.2. Tanulmányt készítettünk az oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow}) elméleti és kísérleti összefüggéseiről, és meghatározásának módszereiről. Az anyagok hidrofób jellegét jellemző K_{ow} hányados megmutatja, hogy egy oktanol-víz kétfázisú rendszerben mennyi az adott szennyezőanyag koncentrációja az oktanolos fázisban a vizes fázishoz képest. Ez az érték összefüggésbe hozható a talajhoz, üledékhez való adszorpció mértékével és a vízi élőlényekben mért biokoncentrációs faktorokkal. Ismertetjük az irodalomban fellelhető kísérleti módszereket és számítógépes programokat az *in silico* meghatározáshoz.

1.1.3. „Szervetlen szennyezőanyagok talajból és talajvízből történő meghatározásának módszerei az EU-ban” címmel összefoglaltuk a szervetlen szennyezőanyagok talajból és talajvízből történő meghatározásának világ- illetve Európai Unió-szinten elterjedt módszereit, kitekintéssel az újabb, javarészt még fejlesztés alatt álló technológiákra is. Az EU tekintetében néhány jellemző vegyületre előírt szabványt soroltunk fel, majd a széles körben használt, illetve kutatott terepi és laboratóriumi módszerekre tértünk ki röviden.

1.1.4. A projekt célja a helyszínspecifikus kockázat megítéléséhez nélkülözhetetlen, de ma még hiányzó módszerek azonosítása és fejlesztése. A módszerfejlesztés kísérleti szakasza előtt tanulmányoztuk az egyes kémiai, biológiai és ökotoxikológiai módszerek kapcsolódó irodalmát. Ezek rövid összefoglalása és értékelése az adott eljárásokról készült tanulmányok részét képezik.

1.1.5. A mutációt kiváltó anyagok potenciális veszélyt jelentenek, a sejtvonalakban mutációs változásokat okozva a későbbi generációkban is. Ez előre mozdítja a géntoxikológiai tesztek alkalmazását a környezeti minták vizsgálatában és a módszerek fejlesztését.

Célunk, egy, a talaj közvetlen tesztelésére is alkalmas géntoxikológiai eljárás kidolgozása. Munkánk első részében áttekintettük és feltérképeztük a témában rendelkezésre álló irodalmat, tanulmányt készítettünk a napjainkban alkalmazott genotoxicitási tesztekéről.

1.2. KÍSÉRLETI MUNKA, MÓDSZERFEJLESZTÉS

A helyszínspecifikus kockázat mindkét oldala támogatható mérésekkel, de adatbázisokból származó adatok alapján közelítő számítással kapott eredmények validálását is szolgálhatják. A kitétség felméréséhez, az előre jelezhető koncentráció értékének (PEC) meghatározásához talajra specifikus, a szennyezőanyag hozzáférhetőségét is figyelembe vevő mérési módszerek (fizikai – kémiai módszerek) szükségesek. A vegyi anyagok hatásának ismeretéhez és a károsan még nem ható koncentráció meghatározásához (PNEC) biológiai és környezettoxikológiai mérésekre van szükség.

1.2.1. Fizikai-kémiai módszerek

1.2.1.1. Szerves szennyezőanyagok és komponensek műszeres kémiai analízise (gázkromatográfia)

Laboratóriumi mikrokozmosz kísérletekből származó dízelolajjal és transzformátorolajjal szennyezett talajmintákat extraháltunk hexán-aceton (2:1) eleggyel és az extraktumokat HP-1 oszlopon kromatografáltuk a 21470-94 számú Magyar Szabvány szerint. A dízel olajjal szennyezett talajminták esetén a biodegradáció előrehaladtával a lineáris szénhidrogének mennyisége csökkent, az izoprenoidok egymáshoz és a megfelelő normál alkánokhoz viszonyított aránya ($n\text{-C}_{17}\text{H}_{36}$ /prisztán, $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ /fitán és prisztán/fitán) kisebb lett, mivel az izoprenoidok lassabban bomlanak a normál alkánoknál (**2. számú melléklet**).

A szabvány módszer nem törekszik az egyes komponensek szétválasztására, a biodegradáció folyamatainak mélyebb megértéséhez viszont szükség lehet erre. A módszerfejlesztés terve elkészült. Egy új, speciális GC oszlop segítségével - amely bizonyos mértékű szétválasztást tesz lehetővé - fogjuk vizsgálni a laboratóriumi kísérletről származó talajminták extraktumait.

1.2.1.2. Oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow}) meghatározásának kidolgozása, ciklodextrinek megoszlásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Áttekintettük a K_{ow} meghatározási módszerek irodalmát. A K_{ow} kísérleti meghatározására alapvetően két módszer terjedt el: folyadék-folyadék extrakciós módszer és HPLC.

A folyadék-folyadék extrakciós módszer lényege, hogy ismert mennyiségű vizsgálandó anyagot adunk ismert térfogatú oktanol és vizet tartalmazó rázóüvegsérbe, a két fázist alaposan összerázzuk, majd az egyensúlyi koncentrációk kialakulása után hagyjuk szétválni, és mindkettőben megmérjük a vizsgálandó anyag koncentrációját. A koncentráció mérésére legelterjedtebb az UV abszorpció meghatározása. Előnye a nagy pontosság, az, hogy a vegyületek széles körére alkalmazható és nem kell előre ismerni az anyag szerkezetét. Hátránya, hogy időigényes, az egyensúly beállása 30 perc.

Gyorsabb módszer a HPLC alkalmazása, amelynek során a vizsgálandó anyag retenciós idejét hasonlítjuk össze ismert K_{ow} hányadosú anyagok retenciós idejével. A módszer előnye a gyorsasága, hátránya, hogy ismerni kell a molekul szerkezetet. Hasonló szerkezetű, ismert K_{ow} hányadosú összehasonlító standardokra van szükség, melyek segítségével meghatározzuk az adott anyagcsoportra jellemző retenciós idő – K_{ow} korrelációs faktort és ezzel a vizsgálandó anyag K_{ow} értékét. A korrelációs faktor vegyületsoportonként különböző.

Újabban a micelláris elektrokromatográfiát is kipróbálták a K_{ow} meghatározásra. Nátrium kolát, mint felületaktív anyag jelenlétében a $\log K_{ow}$ 1,0-5,5 tartományban meghatározható, a hiba 0,5 egységnek kisebb. Ez tehát egy gyors, kis anyagigényű módszer².

További lehetőség a K_{ow} meghatározására a kémiai szerkezeten alapuló számítási (*in silico*) módszerek alkalmazása. Gyűjtőnevük az angol nyelvű rövidítés alapján QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Ilyenek az EU kockázatfelmérési technikai útmutatóban³ ajánlott CLOGP (Daylight Chemical Information Systems, Los Altos, California, LOG K_{ow}) (Syracuse Research Corporation, Syracuse, USA) és AUTOLOGP (Devillers, J. *Analisis*, 1999, 27, 23-28) programok. Az első kettő a molekulán belüli fragmentumok lipofilicitását jellemző ún. fragment-konstansok egyszerű összeadására épül, a harmadik más elven alapul. Egyikkel sem lehet sok K_{ow} értékét kiszámítani. Nitro vegyületek csak az AUTOLOGP programmal számíthatók. A CLOGP és a LOG K_{ow} segítségével jól becsülhetők a 0-5 közötti $\log K_{ow}$ értékek, míg az AUTOLOGP az 5-nél nagyobb értékekre ad pontosabb becslést.

A CLOGP ingyenesen használható az interneten (www.daylight.com). A LOGKOW program egy továbbfejlesztett verziója a KOWWIN, amely része az EPI (Estimation Program Interface) Suite komplex programnak. Ennek az EPA által finanszírozott ingyenesen letölthető programmal az aerob biodegradáció valószínűsége, a talaj adszorpciós koefficiense (K_{oc}), a vizes oldékonyság és a hidrolízis sebessége is becsülhető.

Az interneten talált további fragment-alapú programok a kínai XlogP (Peking University, www.cheminfo.pku.edu.cn/calculator/xlogp) és a szlovák miLogP (Molinspiration Cheminformatics, www.molinspiration.com). Ez a két program a gyógyszeriparban fontos bioaktivitási faktorokat (pl. ioncsatorna moduláló hatás, kináz-aktivitás) is kalkulál.

Léteznek a neurális hálózatokon alapuló közelítések. Az EU útmutatóban ajánlott AUTOLOGP ennek egy korai változata (7200 vegyületből áll a tanuló adatbázis). Az újabb on-line használható programok: az Interactive Analysis logP predictor (www.logp.com) és ALOGPS (vcclab.org/lab/alogps) már

² Wu, Y.S., Lee, H.K., Li, S.F.: Rapid estimation of octanol-water partition coefficients of pesticides by micellar electrochromatography, *Electrophoresis*, 1998, 19, 1719-27

³ Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Part III)

kb. kétszer ekkora adatbázisra épül. Az Interactive Analysis logP predictor (ChemSilico LLC, USA, www.logp.com) 13000 szerves molekula pontosan megmért $\log K_{ow}$ értékei alapján végzi a becslést. Az ALOGPS program (Virtual Computational Chemistry Laboratory, Franciaország, vcclab.org/lab/alogs) 12908 molekulát tartalmazó adatbázis.

Kidolgoztunk egy egyszerű módszert illékony vegyületek K_{ow} értékeinek meghatározására gázkromatográfiás gőztéranalízissel. A mérést valójában a folyadék-folyadék extrakció módszerével végeztük, de mivel a vizsgált vegyületek jelentős része nem UV-aktív, viszont illékonyak, a koncentráció mérésére gázkromatográfiás gőztér-analízist alkalmaztunk. A méréseket még nem fejeztük be, a következő jelentésben egészítjük ki a mért adatok oszlopát.

A mért, a számított és az irodalmi $\log K_{ow}$ értékeket a **3. melléklet 3.1. táblázatban** tüntettük fel.

A CLOGP és a K_{OW} WIN programhoz tartozik egy adatbázis az irodalomban közölt kísérletileg meghatározott K_{ow} értékekről. A CLOGP adatbázisa a LogPstar, a KOWWIN adatbázisa az Experimental database for KOWWIN. A két adatbázis a C10-C12 alkánok kivételével általában azonos kísérleti adatokat tartalmaz (a KOWWIN adatbázisa az irodalmi hivatkozást is megadja). A saját mérési eredmények elfogadhatóan egyeznek az irodalomban leírt kísérleti úton meghatározott értékekkel, kivéve a trimetil-benzolokat és az etil-benzolt. Ezeket a méréseket ellenőrizni fogjuk.

Mindegyik program jó becslést ad az aromás vegyületek esetén, kivéve a diklórbenzolt. Erre a vegyületre a miLogP, XLOGP és ALOGPS program is több mint 20%-kal kisebb $\log K_{ow}$ értéket számít, mint a mért érték. A miLogP hasonló módon alábecsüli a n-alkánok értékeit is. Jelentős eltérést tapasztaltunk még a heptán és oktán esetében a KOWWIN program alkalmazásakor, valamint az undekán esetében az XLOGP programmal.

A ciklodextrinek (CDk) javítják a komplexbe zárt anyagok vízdékonyságát és ez a K_{ow} csökkenését eredményezi. Minél nagyobb egy vegyület K_{ow} értéke, annál inkább komplexet képez a ciklodextrinnekkel, annál jobban növekszik oldékonyságuk a vizes CD oldatokban. Ezt a fordított arányosságot számos talajszennyező szénhidrogénre (alkánok, PAH vegyületek) kimutatták⁴. A megnövekedett vízdékonyság a látszólagos K_{ow} érték csökkenését jelenti CDk jelenlétében.

A hidrofíli CDk (pl. a természetes CDk: α -, β - és γ CD valamint a hidroxipropil származékok) nem oldódnak oktanolban, viszont a β CD és származékai komplexálni képesek az oktanol (3. számú melléklet 3.1. ábra). A komplexképződés egyensúlyi állandója: $2,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ β CD és $1,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ γ CD esetén⁵. Emiatt az oktanol jelenléte csökkentheti a szolubilizált szennyezőanyag koncentrációt. Ez a jelenség gyógyszerek esetén jól ismert (3.2. ábra)⁶. Az oktanol és a szolubilizálandó vendégmolekulák versenyeznek a CD gyűrűért. Még bonyolultabb a helyzet, amikor amfifíli CD származékokat használunk, pl acetil- és metil-származékokat, melyek vízben is és oktanolban is oldódnak. Összeállítottunk egy kísérleti tervet, amelyben a három természetes CD mellett három β CD származékot vizsgálunk, köztük az amfifíli sajátságú acetil- és metil- β -ciklodextrint.

1.2.1.3. Talaj-víz megoszlási hányadosok (K_d) meghatározása különböző típusú talajokra egyes szerves szennyezőanyag komponensekre és tipikus talajszennyező szénhidrogénkeverékekre, a különféle ciklodextrinek hatása a megoszlásra

Az, hogy a talajon mennyi szennyezőanyag adszorbeálódik a megoszlás határozza meg, másrésztől a megoszlástól függ, hogy milyen mértékben szennyeződik a talajvíz a szennyezett talaj által.

K_d : a szennyezőanyag megoszlása a talaj és a víz között, csak az adott szennyezőanyag koncentrációra és talaj/oldat arányra érvényes. Minél régebbi a szennyeződés, annál nagyobb érték⁷.

⁴ McCray, J. E.; Boving, T. B.; Brusseau, M. L.: Cyclodextrin-enhanced solubilization of organic contaminants with implications for aquifer remediation, Ground Water Monit. Rem. 2000, 20, 94-103

⁵ Nakajima, T; Sunagawa, M; Hirohashi, T: Studies of cyclodextrin inclusion complexes. II. Application of the partition coefficient method, Chem. Pharm. Bull. 1984, 32, 401-8

⁶ Måsson, M.; Sigurdardottir, B.V.; Matthiasson, K.; Loftsson, T.: Investigation of drug-cyclodextrin complexes by a phase-distribution method: some theoretical and practical considerations, Chem. Pharm. Bull. 2005, 53, 958-964

⁷ Nudelman, N.S., Rios, S.M., Katusich, O.: Fate of the oil residuals in Patagonian soils, effect of the environmental exposure time, Soil Sedim. Water, 2002, April, 1-8

K_{oc} : a talaj szerves széntartalma és a víz közötti megoszlási hányados. Azt mutatja meg, mennyire adszorbeálódik az adott szennyezőanyag a talaj szerves anyagán, emiatt meghatározza a szennyezőanyag sorsát a talaj-víz rendszerben. Független a talaj ásványi összetételétől⁸. A K_d értékéből úgy származtatjuk, hogy osztjuk a szerves C-tartalommal. A legtöbb talajszennyező vegyület K_{oc} értékei táblázatokban megtalálhatók⁹.

A K_{oc} meghatározására többféle módszer ismert. A legelterjedtebb az egyensúlyi módszer, amikor a vizes fázis és a talaj közötti egyensúly beállása után mérjük meg a koncentrációkat a két fázisban. Az egyensúly beállása 4-96 órát vesz igénybe, emiatt ez a módszer lassú. Fordított fázisú folyadékkromatográfiában (oktadecil-, oktil-, cianopropil-, fenil-szilika tölteten) a retenciós idő a K_{oc} értékkel csökken¹⁰, és a K_{oc} egy kalibrációs görbe segítségével ismeretlen vegyületekre is becsülhető. Az ún. soil leaching column chromatography (SLCC) módszer standard talajjal töltött kolonnát használ a K_{oc} meghatározására¹¹.

1.2.1.4. A ciklodextrinnel extrahálható szennyezőanyag mennyisége és a biodegradálhatóság közötti összefüggés vizsgálata

A biológiailag hozzáférhető szennyezőanyag koncentrációjának meghatározásához a szerves oldószeres extrakcióhoz képest kevésbé „kimerítő” kivonási módot kell találni. PAH vegyületek vizes extrakcióját megfelelő szorbens (Tenax vagy XAD2 gyanta) jelenlétében hosszú ideig (120 nap) végezve deszorpciós görbék vehetők fel, amelyek összefüggésbe hozhatók a biológiai hozzáférhetőséggel¹². Butanolos extrakcióval kinyert fenantrén koncentráció lineáris összefüggést mutat a bakteriális lebontással és a földigiliszta által felvett koncentrációval¹³. Más szerzők szerint viszont a butanolos extrakció túlbecsüli a biodegradálható fenantrén-koncentrációt¹⁴. Ez nem egy általánosan használható módszer: más szennyezőanyag esetén más oldószer ad megfelelő eredményt, ráadásul ez a kiválasztott tesztorganizmustól is függ¹⁵.

A hidroxipropil ciklodextrin (HPBCD) vizes oldatával kiextrahált fenantrén mennyisége szoros korrelációt mutat a biodegradálható frakcióval¹⁶. PAH-vegyületekkel krónikusan szennyezett üledékek esetén bebizonyosodott, hogy a vizes HPBCD oldat a könnyebben deszorbeálódó és biodegradálódó komponenseket oldja ki, míg pl. egy tenzid (Triton X-100) a rosszabbul oldódó, nehezebben biodegradálódó komponenseket is¹⁷.

Ez a módszer egyre elterjedtebbé válik. A legutóbbi *ConSoil* (Contaminated Soil) konferencián már három közleményben alkalmazták PAH-vegyületek¹⁸, régi szénhidrogén-szennyeződés¹⁹ és vegyes

⁸ Means, J.C., Wood, S.G., Hasset, J.J., Banwart, W.L.: Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils, *En. Sci. Technol.* 1980, 14, 1524-1529

⁹ EPA/540/1-86/060 www.nmenv.state.nm.us/ust/docs/gui-table4-3.doc

¹⁰ Kördel, W., Kotthoff, G., Müller, J.: HPLC-screening method for the determination of the adsorption-coefficient on soil—Results of a ring-test. *Chemosphere* 1995, 30:1373–1384.

¹¹ Xu, F., X.- Liang, M., Lin, B.-C., Su, F., Zhong, H.-M., Schramm, K.-W., Kettrup, A.: Soil leaching column chromatographic technique for estimation of leaching behavior of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine, and hydroxyatrazine on soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1999, 63, 87–93.

¹² Hawthorne, S.B., Poppendieck, D.G., Grabanski, C.B., Loehr, R.C.: Comparing PAH availability from manufactured gas plant soils and sediments with chemical and biological tests. 1. PAH release during water desorption and supercritical carbon dioxide extraction, *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 4795-803

¹³ Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M.: Sequestration and realistic risk from toxic chemicals remaining after bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, 214-217

¹⁴ Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T.: Nonexhaustive Cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 3174-3179

¹⁵ Kelsey, J.W., Kottler, B.D.: Sequestration and realistic risk from toxic chemicals remaining after bioremediation, *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, 214-217

¹⁶ Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T.: Nonexhaustive Cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 3174-3179

¹⁷ Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W.: The estimation of PAHs bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques, *Chemosphere*, 2002, 46, 1235-1245

¹⁸ Sabaté, Jordi; Viñas, M.; Solanas, A. M., Proc. 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems, p. 849, 3-7 October 2005, Bordeaux, France

szennyeződésű üledékek²⁰ biológiailag hozzáférhető hányadának jellemzésére. Nem végeztek eddig összehasonlító vizsgálatokat különféle CD-származékokkal: lehet, hogy nem a HPBCD a legmegfelelőbb választás.

Első kísérletsorozatunkban pakurával szennyezett talajt extraháltunk különféle CD féleségekkel (α -, γ CD, hidroxipropil-, random metil-, karboximetil- β CD és polimerek). Az α - és γ CD és ezek származékai nem bizonyultak hatékonyak, ugyancsak elhanyagolható extrakciós képességet mutattak az ionos (karboximetil származékok), noha ezeket az irodalomban leírták éppen PAH-vegyületek (fenantrén) extrakciójára²¹. Az eredményeket a **4. számú mellékletben** foglaltuk össze.

1.2.1.5. Szennyezett talajbank összeállítása

A Becsült Környezeti Koncentráció megbízható jellemzése érdekében egy reprezentatív, szennyezett talajokból álló talajbankot állítottunk össze, ami a magyarországi talajok Cd-, Cu-, Pb-, Zn- tartalmát és tulajdonságait fogja át. A talajminták kiválasztása során a szennyezett talajok széleskörű jellemzésére törekedtünk és figyelembe vettük a szennyezettség mértékét. Ugyanakkor a talajtulajdonságok igen széles tartományát képviselő talajmintákat választottunk ki. A növény általi felvehetőség, a táplálékláncba kerülés megelőzése érdekében igyekeztünk olyan szennyezett talajokat kiválasztani, amelyekben a vizsgálni kívánt négy nehézfém-ion (Cd, Cu, Pb, Zn) koncentrációja várhatóan jól mérhető a talajoldatban.

A Szennyezett Talajbank talajainak vizsgálatával jellemeztük például a kémiai mobilizáció kockázatát a talajokban, meghatároztuk az *in situ* talaj / talajoldat megoszlási hányadosokat, az egyensúlyi talajoldat oldott szerves széntartalmát (ld. 1.2.1.6. fejezet)

1.2.1.6. Összes és mobilizálható nehézfém-tartalom meghatározása különböző kémiai módszerekkel A kémiai mobilizáció kockázata talajokban

A talajok esetében nemcsak a nehézfém-tartalomnak, hanem a nehézfém-tartalom mobilizálódásának is kiemelt fontossága van. A mobilizáció jellemzése érdekében megvizsgáltuk, hogy különböző, szennyezett talajok oldatfázisában mennyi nehézfém van oldott állapotban, mennyi az *in situ* talajokban az oldott nehézfémek tényleges koncentrációja.

Az *in situ* talajoldat nehézfém-tartalmának és az *in situ* talaj / talajoldat megoszlási hányados meghatározásához 33 db talajmintát választottunk ki (**5. számú melléklet 5.1. táblázat**).

A 33 talajminta közül 18 nehézfémmel szennyezett talajminta a Talajvédelmi Információs és Monitoring Rendszer (TIM) mintavételi pontjaiból származik. A TIM 1236 reprezentatív mintavételi helyet tartalmaz²², melyek között szennyezett talajok is találhatóak. Talajmintákat vettünk a Gyöngyös – Tass pusztai kísérleti telepen 1994-ben beállított nehézfém terheléses tartamkísérletből is^{23,24}. Ebben a kísérletben különböző nehézfém dózisokat keverték a talaj szántott rétegébe (0 – 20 cm) és a nehézfémek sorsát követik nyomon az idő függvényében. A Gyöngyös – Tass pusztán beállított nehézfém terheléses tartamkísérlet 12 parcelláját (Cd, Cu, Pb, Zn kezelések) és a kontrolkezelést mintáztuk meg (melyet Gyöngyös0 -ként jelölünk). Az egységes Országos Műtrágyázási Tartamkísérletek (OMTK) közül a B17 -es karcagi kísérletet választottuk ki. A kísérlet 1967-ben kezdődött és az NPK kísérlet-

¹⁹ R. Hough, K. Brassington, A. Sinke, J. Crossley, G. Paton, K. Semple, G. Risdon, C. Jacobson, P. Daly, S. Jackman, G. Lethbridge and S. Pollard: Proc. 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems, p. 1262-1267, 3-7 October 2005, Bordeaux, France

²⁰ T. Grotenhuis, M. Smit, G. Malina, R. Kasperek, J. Szdzuj, B. Satijn, J. Joziassé: Proc. 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems, p. 2513-2522, 3-7 October 2005, Bordeaux, France

²¹ Wang, X., Brusseau, M.L.: Simultaneous Complexation of Organic Compounds and Heavy Metals by a Modified Cyclodextrin, Environ. Sci. Technol. 1995, 29, 2632-2635

²² TIM. 1995. Talajvédelmi Információs és Monitoring Rendszer. 1. kötet. Módszertan. Földművelésügyi Minisztérium kiadványa. Budapest.

²³ Fodor L. 1998. Effect of heavy metals on wheat and maize crop on brown forest soil. Agrokémia és Talajtan. 47, 197-206.

²⁴ Szabó, L. 1998. Mobility of some micropollutants in a brown forest soil. Agrokémia és Talajtan. 47, 191-196.

ben a műtrágya adagok termésre (kukorica, búza) gyakorolt hatását vizsgálják. A legnagyobb NPK adaggal kezelt kísérleti parcellát illetve a kontroll parcellát mintáztuk meg, melyeket B1732 II.20 illetve B1732 II.1 jelzéssel jelölünk. Meghatároztuk a nehézfémek kémiai egyensúlyait befolyásoló talajtulajdonságokat (humusz tartalom; agyagtartalom; összes kadmium-, réz-, vas-tartalom, stb.). A kiválasztott talajok széles talajtulajdonság tartományt jellemeznek (**5.1. táblázat**).

Meghatároztuk a talajok összes nehézfém-tartalmát (mikrohullámú bombában történő roncsolás koncentrált salétromsavval és hidrogén-peroxiddal) és könnyen felvehető nehézfém-tartalmát (Lakanen-Erviö módszerrel) (**5. számú melléklet 5.2. táblázat**).

A 5.1. táblázat adatait elemezve kitűnik, hogy a 14. számú talaj a legsavanyúbb. Ugyanebben a talajban a legkisebb a humusztartalom és az agyagtartalom is. Nyilvánvalóan e kolloidokban szegény talaj rendelkezik a legkisebb puffer kapacitással. A második legsavanyúbb talaj a 29. számú karcagi talaj. Agyag- és humusztartalmát tekintve e talaj jó minőségű, szerves és szervesetlen kolloidokban gazdag, a savanyodás oka ebben a talajmintában az 1967 óta történt műtrágya dózisokra vezethető vissza.

Kiugróan magas szervesanyag-tartalmat képvisel a 30. számú mohaláp talaj. Ebben a talajban a nedvességtartalom nagyobb, mint 100%, ami a szerves kolloidok nagy vízmegkötő képességét jelzi.

Az *in situ*, a növény által felvehető talajoldat kinyerésének módszere

Módszert kellett kidolgoznunk a szabadföldi nedvességtartalmú talajok oldatfázisának kinyerésére. A talajoldat minél pontosabb jellemzése érdekében a mintavételt a fagyok megszűnte után végeztük. A mintavételi idő kiválasztása három tényező figyelembevételén alapult:

- A talajok nedvességtartalma ilyenkor még nagy és így megfelelő mennyiségű *in situ* talajoldat nyerhető ki a kémiai elemzésekhez.
- A talaj szilárd fázisa és folyadékfázisa között feltételezhető a kémiai egyensúly fennállása a hosszú téli nyugalmi időszakot követően.
- A tavasz legelső napjaiban – a felmelegedés és a talajélet megindulása előtt – a talajoldat összetétele jellemzőnek tekinthető, mivel a talaj mikrobiológiai életfolyamatai és a növény gyökerek tevékenysége még nem befolyásolják a talajoldat összetételét.

A talajban lévő nehézfém-ionok a talaj oldatfázisán keresztül kerülhetnek be a növényekbe, ill. a táplálékláncba. Emiatt fontos a növény által felvehetőnek tekintett talajoldat-frakció összetétele, amit konvenció szerint a pF 4,2-nél kisebb szívóerővel kötött talajoldat-frakció jelent.

A laboratóriumba behozott szabadföldi, eredeti nedvességtartalmú, 0 – 20 cm-es szántott rétegből származó talajmintákból azonnal kinyertük a „növény által felvehetőnek” tekintett talajoldat frakciót (pF < 4,2), centrifugálásos módszerünk segítségével²⁵. A kinyert *in situ* talajoldat összetételét részletesen elemeztük (pH_{CaCl2}; kadmium-, réz-, alumínium-, vas-koncentráció, stb.).

Meghatároztuk a nehézfémek kémiai egyensúlyait befolyásoló talajtulajdonságokat is (humusz tartalom; agyagtartalom; összes kadmium-, réz-, alumínium-, vas-tartalom, stb.).

Az oldott szerves széntartalom meghatározása a talajoldatban

Az oldott szerves széntartalom (DOC, Dissolved Organic Carbon) fontos szerepet játszik a nehézfémek sorsának alakításában a talaj / talajoldat rendszerben. Egy új, Magyarországon még nem használt módszert dolgoztunk ki az oldott szerves széntartalom meghatározására.

Az összes oldott szén mennyiségét ICP – AES készülékkel mértük²⁶, két különböző, szénre jellemző hullámhosszon (197,09 nm és 247,856 nm). A széntartalom mennyiségét mindkét hullámhosszon meghatároztuk, és a két érték átlagát tekintettük az összes oldott szén mennyiségének. Az oldott szervesetlen szén mennyiségét pH 4,00-ig történő titrálással határoztuk meg Radiometer Titrab32 titrátorral. Az egyensúlyi talajoldat DOC tartalmát úgy számítottuk ki, hogy az összes oldott szén

²⁵ Csillag J. et al. (1999): Extraction of soil solution for environmental analysis. Intern. J. Environ. Anal.

²⁶ Oweczkin, I. J., Kerven, G. L. & Ostatek-Boczynski, Z. 1996. The determination of dissolved organic carbon by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 27, 47-55.

mennyiségéből levontuk az oldott szerves szén mennyiségét. A kidolgozott módszert ellenőriztük és megbízhatónak találtuk.

Az *in situ*, a növény által felvehető talajoldat összetétele

A „növény által felvehető” talajoldatok összetétele az alábbi tartományokat ölelte át (**5.2. táblázat**):

DOC	= 30–223 mg/L;	HCO ₃ ⁻	= 10–166 mg/L;
Ca	= 14–695 mg/L;	Mg	= 1–43 mg/L;
K	= 1–46 mg/L;	Na	= 4–58 mg/L.

Megállapítottuk, hogy a DOC koncentráció nagyságrendje megegyezik a makroelemek talajoldatban mért koncentrációjának nagyságrendjével. A makroelem koncentrációk összhangban vannak Filep és Csillag adataival²⁷.

Az 5.2. táblázat adatait elemezve kitűnik, hogy két kiugróan magas EC értéket mértünk. Sótartalmát tekintve a 31. számú talajminta közepesen sósnak tekinthető²⁸. A talajoldat nagy EC értékét a kiugróan nagy kation koncentrációk – főként a kalciumionok – okozzák.

A karcagi talaj esetében rendszeresen műtrágyázott talajmintában (29. számú talaj) az EC értéke kb. 14-szer akkora, mint a kontroll talajminta EC értéke (28. számú talaj). A magas sótartalom egyrészt az alkalmazott műtrágyadózisokkal magyarázható. Másrészt viszont fel kell figyelni arra, hogy a 29. számú talajmintában kiemelkedően magas az oldott kalciumion tartalom is. Ez a talajsavanyodás következtében mobilizálódott, oldhatóvá vált kalciumionokra vezethető vissza.

A talajoldat széntartalmát tekintve a 33 vizsgált minta közül az oldott szerves széntartalom 10 mintában minimum 100 mg/L, míg a szerves széntartalom 3 mintában nagyobb, mint 100 mg HCO₃⁻/L. A DOC tartalom természetesen a 30. számú mohaláp talajban a legnagyobb.

Meghatároztuk a négy nehézfém koncentrációját az *in situ*, a növény által felvehetőnek tekintett talajoldatban és a következő nehézfém koncentráció-tartományokat kaptuk:

Cd	= 0–17	µg/L;	Cu	= 11–576	µg/L;
Pb	= 2–11	µg/L;	Zn	= 45–4320	µg/L.

A talajoldat és a talaj nehézfém-tartalma közötti összefüggés

A talajoldat nehézfém-tartalmát a talaj nehézfém-tartalmának függvényében az **5. számú melléklet 5.1. ábrán** mutatjuk be. Mind a Lakanen – Erviö módszer által jellemzett, mind az összes nehézfém-tartalmat ábrázoltuk a vizsgált négy elemre. Az ábrák egyértelműen bizonyítják, hogy az esetek döntő többségében nehézfém-tartalom nagyságrendileg nagyobb a talajban, mint a talajoldatban. A talajoldatban mért koncentrációk a µg L⁻¹ tartományba, a talajban mért koncentrációk a mg kg⁻¹ tartományba esnek. Az eredmények alapján levonható az a következtetés is, hogy a talajoldat és a talaj nehézfém-tartalma között nincs egyértelmű, közvetlen összefüggés.

A nehézfémek megoszlási hányadosa a talaj / talajoldat rendszerben

A talaj / talajoldat rendszer átfogóbb jellemzése érdekében meghatároztuk a nehézfémek megoszlási hányadosát a talajokban. Kiszámítottuk a nehézfémek megoszlási hányadosát (K_p), ami a szilárd fázisban lévő (mg/kg) és az oldatfázisban lévő (mg/L) fémkoncentráció hányadosa:

$$K_p = \text{nehézfém-tartalom szilárd fázis [mg/kg]} / \text{nehézfém-tartalom talajoldat [mg/L]}$$

Kísérleti eredményeink során meghatároztuk a növény által felvehetőnek tekintett talajoldat nehézfém-ion tartalmát és a talajminták összes nehézfém-tartalmát, ami lehetővé teszi a szabadföldi körülmények közötti, *in situ* megoszlási hányados jellemzését.

²⁷ Csillag J. et al. (1999): Extraction of soil solution for environmental analysis. Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 00, pp. 1-20.

²⁸ Filep Gy. & Füleky Gy. (1999) A talaj kémiai tulajdonságai. In: Stefanovits P., Filep Gy. & Füleky Gy. Talajtan. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 86-1130.

A megoszlási hányados azt fejezi ki, hogy mennyivel több nehézfém található a talaj szilárd fázisában az oldatfázishoz képest. A megoszlási hányadosok nagyságrendje azt mutatja, hogy a legtöbb szennyezett talajban 100–1000-szer annyi a kadmium, réz, ólom és cink, mint az oldatfázisban.

A talajminták összes nehézfém tartalmát és az *in situ* megoszlási hányadosokat az **5.3. táblázatban** tüntetjük fel. A táblázat egyértelműen bizonyítja, hogy a talajok nehézfém tartalma több nagyságrenddel meghaladja a talajoldatban mért nehézfém tartalmat. Ez egyúttal azt is bizonyítja, hogy a talajoldat vizsgálata a talajok szennyezettségének jól használható indikátora, de indikátor jellegéből fakadóan csak jelzi a szennyezettség tényét. A 5.3. táblázat egyértelműen ráirányítja a figyelmünket a talajok nehézfém tartalmának mobilizálódását befolyásoló tényezők vizsgálatára.

A továbblépés szempontjai

A szennyezett talajokban meghatározott megoszlási hányadosok egyértelműen bizonyítják, hogy a nehézfém szennyezettség döntő mértékben a talaj szilárd fázisában található és ez határozza meg a talaj oldatfázisának nehézfém-koncentrációját.

A nehézfém tartalom mobilizálódásának jellemzése tehát szükségessé teszi

- a talaj szilárd fázisa és oldatfázisa között fennálló kémiai egyensúlyok jellemzését, és
- a kémiai egyensúlyokat befolyásoló talajtani tényezők hatásának részletes tanulmányozását.

1.2.2. Biológiai és géntechnikai módszerek

1.2.2.1. ATP mennyiség meghatározása talajban lumineszcencián alapuló eljárással

A talaj biológiai állapotára, aktivitására az eddig alkalmazott tesztek mellett egy új módszer alkalmazásával, a talaj teljes adenozin-trifoszfát (ATP) tartalmának meghatározásával is következtethetünk. A talaj ATP tartalma információt szolgáltat a talaj biológiai állapotáról, magában foglalja az összes talajban élő és működő sejt energiaállapotát, így az eljárás alkalmas lehet az anyagcsere és a toxikus hatások követésére is.

Az ATP a sejtek általános energiatároló vegyülete, így minden sejtben megtalálható. Az ATP mennyisége egy sejtben fajonként azonos, tehát a sejtszámra könnyű mennyiségi értéket megadni.

A sejtszám meghatározása közvetlenül a talajból ATP mérés alapján is egy új módszer, mert még senki sem próbálkozott a talaj összsejtszámát direkt biolumineszcenciával meghatározni. A higiénés vizsgálatoknál elterjedt módszer, mely érzékenységeivel pontos, megbízható és reprodukálható eredményt szolgáltatott, új lehetőségeket nyitott meg a minták analizálásában^{29,30}. A talajminták esetében egy speciális mátrixszal van dolgunk, mely háromfázisú és az ott létrejött kölcsönhatások még nincsenek teljesen felderítve. ATP extrakciójára a talajból többféle eljárás ismeretes. Az irodalom többek között triklór-acetát (TCA), foszforsav, szerves oldószerek, pufferek és szulfát tartalmú vegyületek alkalmazását említi az ATP kivonására³¹. Az irodalomban közölt eredmények talajkivonatokra vonatkoznak^{32,33}, amely eredményeket igen óvatosan kell tekintenünk, mert ezek a talajban létrejött kölcsönhatásokról semmit sem mondanak, valamint a talaj pufferaló hatását sok esetben nem veszik figyelembe – tehát nem nézik a biológiai hozzáférhetőséget.

²⁹ Hawronsky, J.-M., Chittock, R.S., Wharton, C.W. and Holah, J. (1995) Low level bacterial contamination measured using a novel bioluminescent assay. *Bioluminescence and Chemiluminescence*. 411-414

³⁰ Thomas, B., Foote, N., Morris, H., Englishby, M., Ferguson, L., Todd, A. and Grant, P. (1995) Application of ATP bioluminescence for the rapid detection and enumeration of microbial contamination in personal care products. *Biotech Bulletin*, **5** 187-190

³¹ Alef, K. (1995) Estimation of adenosine triphosphate in soils. In: Alef K & Nannipieri P (Ed) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (pp 194-204). Academic Press, London

³² De Nobli, M., Diaz-Ravina, M., Brookes, P.C. and Jenkinson, D.S. (1996) Adenosine 5'-triphosphate measurements in soils containing recently added glucose. *Soil Biology and Biochemistry* **28/8** 1099-1104

³³ Chander, K. and Brookes P.C. (1991) Microbial biomass dynamics during the decomposition of glucose and maize in metal-contaminated and non-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **23** 917-925

Módszertani fejlesztések

Az ATP mennyiségi kimutatására a luciferin lumineszcens fény kibocsátása melletti, ATP-t igénylő átalakulását használtuk. A kibocsátott fényt luminométerrel mértük.

A módszer kifejlesztésével kettős célkitűzésünk volt: egyrészt a talajok lemezöntéstelepszámlálásos módszerrel nem mérhető élősejtszámának megfelelő ATP mennyiség meghatározása, ami egyben a talajaktivitásról is ad információt, valamint a tenyésztéses sejtszám meghatározás hibáinak kiküszöbölése. Célunk nem elsősorban a talaj abszolút ATP tartalmának meghatározása volt, hanem a változások követése. Például az időbeni lefutás a szennyeződés, vagy külső körülmények, vagy a technológiai paraméterek hatására.

A szakirodalmak tanulmányozása után ATP mennyiségi detektálásához két cég – a *Lumac* és a *BioOrbit* – Biomass Kit-jeit alkalmaztuk és hasonlítottuk össze. A BioOrbit kit belső standard módszerrel dolgozik, míg a Lumac kit egy standardizálás alapján meghatározott konstans segítségével számítja a minta ATP tartalmát.

A sejtszám meghatározásához, a sejtszám-ATP kalibrációhoz *Escherichia coli* és *Bacillus subtilis* sejtszuszpenziót készítettünk. A mikroorganizmusokat tartalmazó talajminták ATP tartalmának meghatározását, a módszer kidolgozását a következő lépésekben végeztük:

1. optikai denzitás (ODE) - sejtszám (lemezöntéses) összefüggés megállapítása,
2. optikai denzitás - ATP mennyiségi összefüggésének megállapítása,
3. a talaj ATP tartalmának feltárására szolgáló Lumac és Bioorbit kit-ben lévő reagensek hatékonyságának vizsgálata és összehasonlítása a lizozimos, a Na-dodecil-szulfátos (SDS), valamint a lizozimot, és utána SDS-t alkalmazó feltárással,
4. a talaj ATP és sejt adszorbeáló képességének vizsgálata,
5. szénhidrogénekkal és nehézfémekkel szennyezett talajok vizsgálata: a szennyező anyagok biolumineszcencia gátló, azaz ATP kimutathatóság gátló hatásának tanulmányozása.

A mikroorganizmus tenyészetekkel végzett ODE – ATP biolumineszcencia összefüggésének megállapítása során eredményeink azt mutatták, hogy az ATP biolumineszcencia érzékenyebb és pontosabb mérési módszer, mint az optikai denzitás mérés.

A különböző sejteltérő reagensek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az általunk párhuzamosan vizsgált lizozim és SDS hatékonysága elmaradt a kitekben alkalmazott reagensekétől.

A direkt érintkezést biztosító módszer kifejlesztése talajok / üledékek vizsgálatára sikerült. A szennyezett talajok vizsgálata során a szennyező anyagok (Zn, Cu, Pb, Cd és transzformátor olaj) nem zavarták az ATP-biolumineszcenciát.

A bemért talajmennyiség és a mért ATP-tartalom összefüggését vizsgálva viszont azt tapasztaltuk, hogy 0,02 g talajnál a görbének maximuma van. 0,02 g alatt a talajmennyiséggel arányos ATP mennyiség mérhető. 0,02 g talajmennyiség fölött a talaj lumineszcencia elnyelése dominál, ez bizonytalanra teszi az eredményt, ennek korrigálására további vizsgálatok szükségesek.

Továbbá, az ATP teljes feltárása gyakorlatilag nem érhető el, és a különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező talajoknál, az ATP deszorpciója is különböző mértékű lehet.

Az ATP mennyiség meghatározására talajban egy direkt kontakt módszert kifejlesztettünk, de a tesztelés során felmerülő különböző problémák (pl. lumineszcencia elnyelés) kiküszöbölésére még további kísérletek, módszertani fejlesztések szükségesek.

1.2.2.2. Fluorescens in situ hibridizáció (FISH) talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározására

Napjainkban a molekuláris biológia és a mikrobiális ökológia egyesítése olyan új, nukleinsav vizsgálatán alapuló technikák kifejlesztéséhez vezetett, amelyekkel speciális génszekvenciák jelenlétét lehet meghatározni. DNS és RNS vizsgálatokkal jellemezhető egy szennyezett terület mikroba-közössége, struktúrája, katabolikus aktivitása, valamint meghatározható a biodegradációba bevont mikroorganizmusok degradatív enzimkapacitása. Jellemezhető a mikrobapopulációban bekövetkező változások. A mért adatok szükségesek egy terület öntisztulóképességének becsléséhez és a helyszínspecifikus kockázat jellemzéséhez.

Az *in situ* hibridizációs módszereknél a jelzett próba specifikusan köt az egyszálú target szekvenciához a sejten belül. Fluoreszcens *in situ* hibridizációnál (FISH) a fluoreszcens festékekkel jelzett oligonukleotid köt a rRNS target szekvenciájához. Az aktív sejtekben a rRNS nagy számban van jelen, így a mikroszkópban erős jelet kapunk. Taxonómiai vizsgálatokra is alkalmas a módszer, mert a rRNS konzervált és variábilis régiójához is tervezhető általános ill. fajspecifikus próba. Különböző fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotidokkal egyszerre vizsgálható egy mikrobaközösség. Jól értékelhető információ nyerhető a látható, de nem tenyészthető sejtekről. Ezzel a molekuláris biológiai módszerrel *in situ* mérhető a sejtek aktivitása, specifikus mRNS darabok detektálásával adott enzimek termelődése^{34,35}.

A módszer lehetővé teszi a baktériumok gyors és pontos minőségi és mennyiségi meghatározását természetes környezetükben. A mikroszkópos analízis legfontosabb előnye a többi molekuláris biológiai technikával szemben, hogy információt ad a mikroorganizmusok morfológiai jellemzőiről, szerkezetéről, számáról, térbeli elhelyezkedéséről^{36, 37}. Egyszerre több, különböző festékekkel jelölt oligonukleotid próba hibridizációja vizsgálható, ha az emittált fény eltérő hullámhosszúságú.

A FISH módszert szeretnénk adaptálni talaj-mikroorganizmusok vizsgálatára, különös tekintettel szerves szennyezőanyagok degradációjára képes mikroorganizmusok valamint nehézfém-tűrő mikrobák detektálására, mennyiségi és minőségi meghatározására.

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerét Amann *et al.* (1990) és Manz *et al.* (1992) nyomán dolgoztuk ki^{34, 38}. A talaj közvetlen molekuláris biológiai vizsgálatát célzó kísérlet első lépéseként a FISH-t az általunk talajból izolált tiszta mikrobakultúrákon végeztük el. A magas fémkoncentrációjú talajmintákat a Gyöngyösoroszi volt bányaterületen található szállítási útvonalról gyűjtöttük. Az izolálási és adaptációs lépéseket követően 10 mikrobát választottunk ki a további munkához, 4 gombát és 6 baktériumot.

A kidolgozott FISH módszer lépései a következők:

- 1/a. Paraformaldehiddel történő (PFA) fixálás (Gram negatív sejtek meghatározására)
- 1/b. Etanollal történő fixálás (Gram pozitív sejtek meghatározására, közvetlenül hibridizáció előtt)
2. Speciális mintaelőkészítés, a hibridizációs próba penetrációját elősegítő permeabilizáció (lizozimes majd ezt követően proteináz K-val történő kezelés, végül savas hidrolízis)
3. Hibridizáció és a nem hibridizált próbák eltávolítása mosással:
A baktériumokat az univerzális EUB338 eubakteriális próba hibridizációja által detektáltuk, amellyel bizonyítható a fixálás eredményessége, a próba megfelelő sejtbe jutása.
4. Összes élő és élettelen sejtszám meghatározása DAPI festéssel
5. Értékelés mikroszkóppal és dokumentáció: a preparátumokat Episcopic Fluorescent Attachment V-FM-feltéttel ellátott Nikon Eclipse E400-as mikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket SPOT INSIGHT Color kamerával készítettük **(6. számú melléklet)**.

Az eredmények alapján 2 addig fonalas baktériumnak tekintett mikrobát a gombák közé soroltunk. A módszer mind a Gram pozitív, mind a Gram negatív baktériumokra biztosan működött, a vizsgált kontroll gombára és a fonalas „baktériumra” pedig jól megkülönböztethető negatív eredményt adott. Ismert baktériumkultúrával beoltott mesterséges és természetes talajok tesztelése jelenleg folyik.

³⁴ Amann, R., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762-770.

³⁵ Amman, R.I. et al., 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbil. Rev.* 59, 143-169.

³⁶ Li, S., Spear, R.N., Andrews, J.H., 1997. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscopic slides and leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3261-3267.

³⁷ Poulsen, L.K., Ballard, G., Stahl, D.A., 1993. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1354-1360.

³⁸ Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of proteobacteria. Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.

1.2.2.3. Növényakkumulációs teszt tenyészedényes kísérletekkel (BCF meghatározása)

Talajok toxikus fémtartalmának növényekben való feldúsulása két szempontból fontos:

- A táplálékláncon keresztüli kitettség növeli a toxikus fémek emberre és az állatokra vonatkozó kockázatát. Az egyre szennyezettebb és savanyúbb talajokból egyre több toxikus fém kerül a táplálékláncba, amely a tápláléklánc mentén hatványozott feldúsulást, így hatványozott kockázatot jelenthet.
- A növények fémakkumulációja, elsősorban az adaptálódott enzimszisztemek köszönhető hiperakkumuláció akár technológiai megoldást is jelenthet a talajok fitoremediációja révén.

A biológiai hozzáférhetőség meghatározó a tápanyagellátás, a biodegradáció, a bioakkumuláció és a vegyi anyag káros hatásainak szempontjából³⁹.

A bioakkumuláció az élőlények azon tulajdonsága, hogy egyes elemek, illetve vegyületek környezetből történő felvétele eredményeképpen saját szervezetükben nagyobb koncentrációt hoznak létre, mint amekkora a forrásul szolgáló környezeti elemekben volt, tehát ezeket az elemeket vagy vegyületeket koncentrálnak, feldúsítják sejtjeikben vagy egyes szöveteikben. Biokoncentrációnak is nevezik, mértékét a biokoncentrációs faktor (BCF) jellemzi.

A BCF megadja, hogy a bioakkumulációra képes élőlény a vele érintkező környezetben lévő elem vagy vegyület koncentrációját hányszorosára növeli meg saját szervezetében. Nagyságát az egyensúlyi állapotban mérhető: $C_{\text{élőlény}}/C_{\text{környezet}}$ hányados adja meg³⁹.

A *bioakkumulációs tesztek* a tesztorganizmusok azon tulajdonságát használják ki, hogy azok képesek felvenni és raktározni a toxikus anyagokat.

A bioakkumulációs teszt kivitelezése

A bioakkumulációs tesztekhez felhasznált két talaj Gyöngyösorosziból származik. Az egyik talaj (szennyezett) egy patak menti kiskertből, a pataktól körülbelül 10 m-re (K14). A másik (szennyezetlen) a pataktól 400 m-re lévő kertből (M45).

A K14 jelű talajjal a savasodás modellezésére végeztünk kísérletet. A környezet savasodása miatt bekövetkező felvehető fémtartalom változást vizsgáltuk. A célunk az volt, hogy egy ill. két pH egységgel csökkentsük a K14 talaj pH-ját, kénsav hozzáadásával (K14, S1, S2).

Két meddőközet kupacról származó közettel szennyeztük az M45 talajt. Ezzel a területen előforduló kockázatos folyamatot, a hulladék talajhoz keveredését modelleztük (M45+m).

Összehasonlításként a szennyezett területeken nagyobb mennyiségben található nehézfémekkel (As, Cu, Zn, Pb, Cd, Hg) szennyeztük a szennyezetlen kerti talajt (M45+5B).

Sóskából, petrezselyemből, sárgarépbából 100-100 magot vetettünk cserepenként, metélőhagymából 50-et. A magokat igénytől függően 0,5-1,5 cm mélyre ültettük. A cserepenként közelítőleg hasonló növényszámot nem vagy ritka kelés esetén pótvetéssel sűrű állománynál pedig egyeléssel igyekeztünk beállítani. A tenyészedényes bioakkumulációs kísérlet jellemző paramétereit a **7.számú melléklet 7.1 táblázatban** foglaltuk össze.

Az eredmények értékelése során vizsgáltuk a talajokban a szennyezés, illetve a savanyítás hatására bekövetkező felvehető fémtartalom változást és ennek hatását a növényi fémfelvételre. Az összes toxikus fémtartalom analitikai meghatározása királyvizes feltárás után, a mobilis toxikus fémtartalom analitikai meghatározása Lakanen-Erviö feltárás után, (híg pufferoldattal: ammónium-acetát, ecetsav, EDTA) ICP-MS analitikai eljárással történt. A növények fémkoncentrációját ICP-MS eljárással határoztuk meg királyvizes feltárás után.

Meghatároztuk az aerob heterotróf sejtszámot és a fémtűrő sejtek számát hígítós lemezöntéssel, teleshámlásos módszerrel.

A talajok toxicitását háromféle növényi tesztorganizmussal gyökér-, illetve szárnövekedés gátlási teszt alkalmazásával vizsgáltuk: *Sinapis alba* (fehér mustár), *Lactuca sativa* (saláta), *Lepidium sativum* (kerti zsázsa).

A talajok és a növények fémtartalma alapján bioakkumulációs faktort számítottunk. A BCF értékeket összehasonlítottuk talajok, növények és fémek szerint.

³⁹ Gruiz, K.; Horváth, B. és Molnár, M. (2001) Környezettoxicológia, Műegyetemi Kiadó, Budapest

$$BCF_{\text{összes}} = \text{koncentráció}_{\text{növény}} / \text{koncentráció}_{\text{talaj, összes}}$$

$$BCF_{\text{mobilis}} = \text{koncentráció}_{\text{növény}} / \text{koncentráció}_{\text{talaj, mobilis}}$$

Eredmények

A növények csírázását vizsgálva megállapítottuk, hogy a sárgarépa kivételével jól látható különbség van a szennyezetlen (M45) és szennyezett talajban (M45+m) csírázott magok számában (**7.1. ábra**).

A **7.2. ábra** mutatja a bioakkumulációs kísérlet tenyészedényeit 1 hónap elteltével.

A növények tömegmérésének eredményei alapján elsősorban a sárgarépa, de kisebb mértékben a petrezselyem gyökerek össztömege között látható különbség a szennyezett és szennyezetlen talajban. A metélőhagymánál és a sóska esetén nem figyelhető meg jelentős különbség.

A savanyítás hatását vizsgálva sóskánál megfigyelhető kis különbség az összértékekben: a K14 talajban kis mértékben nagyobb volt a terméshozam, mint az S1 és S2 talajokban. A petrezselyem esetén ellentétes tendencia figyelhető meg.

A kémiai módszerrel meghatározott mobilis fém tartalom nem minden esetben tükrözi a ténylegesen felvett fém tartalmat. A meddőközettel szennyezett talajban az ólom, a réz és a cink mobilis fém tartalma növekedett meg, ennek ellenére a növényekben mindegyik fém esetén növekedés volt megfigyelhető. A szennyezett kerttalaj esetén a talaj savanyítása után meghatározott felvehető fém tartalom nem mutatott változást, a növényekben azonban itt is növekedett a fém tartalom.

A $BCF_{\text{összes}}$ és a BCF_{mobilis} értékeket talajok, növények, fémek szerint a **7.2. és 7.3. táblázat** mutatja.

A bioakkumulációs értékek nagy eltérést mutattak növények, fémek és talajok szerint. Általában az arzént és a rezt a metélőhagyma és a petrezselyem gyökér akkumulálta legjobban, a kadmiumot, az ólmot és a cinket a metélőhagyma, a sóska és a sárgarépahajtás. Azonban különbség volt mérhető a növények akkumulációjában a különböző szennyezettségű talajokban, általában a nagyobb fém tartalmú talajokban az akkumuláció is nagyobb mértékű volt. Az akkumuláció mértéke több esetben növekedést mutat a pH csökkenésével.

Nem lehet általánosítani a gyökeres zöldségekre sem, hiszen sárgarépa esetén a hajtás akkumulálta jobban a fémeket, petrezselyem esetén a gyökérben mérhető magasabb fém tartalom (As, Cd). A hagyma és a sóska pedig a tenyészidő alatt is eltérő mértékben akkumulálták a fémeket.

A legnagyobb mértékben akkumulálódó fémek általában a cink, a réz és a kadmium. A kísérletből kapott minták esetén általában a cink akkumulálódik legjobban, de több esetben a közettel történő szennyezés, illetve a savanyítás hatására a kadmium nagyobb mértékben akkumulálódott.

Ha ismernénk a növények BCF értékét, akkor a talajok fém tartalom adatai alapján lehetne kockázatot számítani. Azonban a kísérlet eredményei azt mutatják, hogy az akkumuláció mértéke nagyon sok tényezőtől függ. Nem jellemző egyértelműen egy adott fémre, és növényfajra, hanem függ a talaj szennyezettségének mértékétől, a talaj pH-jától, és sok egyéb tényezőtől, mint pl. a tápanyagtartalom, szervesanyag-tartalom.

A növényi tesztorganizmusokkal végzett ökotoxikológiai tesztek jól mutatták az oldható fémsókkal szennyezett talaj toxicitását, amelyben nem tudtak kifejlődni a növények. A többi talaj esetén az eredmények nem voltak egyértelműek. A vizsgált talajok krónikus hatásukban veszélyesek, azaz a növények növekedését nem gátolják nagymértékben, így a növények akkumulálják a fémeket.

A bioakkumuláció talaj- és növény-specifikus volta miatt rosszul becsülhető meg a kémiai eredmények alapján, így a kockázat megítélése céljából laboratóriumi biotesztek alkalmazását javasoljuk. A laboratóriumi biotesztek alapján a vizsgálat céljától függően már kiválasztható a megfelelő teszt növény, a tesztelés módja és időtartama és a mérendő végpontok.

1.2.3. Mikrokozmosz teszt toxikus fémekkel szennyezett talajok stabilizációjára

Toxikus fémekkel szennyezett talajok remediálására egyre inkább előtérbe kerülő biotechnológia a fitoremediáció, azaz a növényekkel történő kockázatsökkentés. Ennek egyik fajtája a fitostabilizáció, mely során a toxikus fémeket tűrő, és föld feletti szerveikben kis mennyiségben akkumuláló növényekkel fedik le a szennyezett területet^{40,41}. A növénytakaró megtelepedése a korábban kopár területen

⁴⁰ Gruiz, K. (1999) Szennyezett talajok remediálása – In: Talajszennyeződés, talajtisztítás (Szerk.: Simon L.) Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest, pp. 145–164

megakadályozza a szennyezett talaj szél és víz általi erózióját, és határozottan csökkenti a talajvízbe történő kioldódást⁴².

A fitostabilizációval csökken a környezet további elszennyeződésének veszélye és az élővilág szennyezett anyagoknak való kitettsége⁴³.

Abban az esetben, ha a fémek hozzáférhetősége a növények számára nagyon nagy, még a fém-toleráns növények sem képesek minden esetben megtelepedni. Ilyen feltételek esetén a talajhoz fémeket immobilizáló adalékanyagokat adnak, amelyek csökkentik fitotoxikus hatást^{44,45}. A stabilizálószer a talajban csökkenti a fémek mozgékonyágát, ezáltal csökkenti a fémek felvehetőségét, és elősegíti a növények megtelepedését.

A fitostabilizáció első lépéseként tehát adalékanyagot juttatnak ki a területre, melynek azon kívül, hogy hatékonyan megkötö a szennyezőanyagokat, hosszú távon is meg kell őriznie ezt a tulajdonságát. Az adalékanyag legyen olcsó, könnyen előállítható, kezelhető és kijuttatható, ne legyen veszélyes az élővilágra. Előnyös, ha az adalékanyag tápanyagokat biztosít a növények számára, és növeli a szennyezett közeg vízfelvevő, vízmegtartó képességét⁴³.

Kísérleti munka

Laboratóriumi mikrokozmosz kísérleteket indítottunk toxikus fémek stabilizációjára különböző adalékanyagokkal. Célunk egy olyan adalékanyag kiválasztása volt, amely mind a fémek oldhatóságát, mind biológiai hozzáférhetőségét a lehető legjobban lecsökkenti, és hosszú távon is megtartja ezt a tulajdonságát.

Munkánk során egy galvanizáló üzem telephelyéről származó, ipari és egy, a bányászati tevékenység hatására elszennyeződött mezőgazdasági talajban vizsgáltuk a toxikus fémek stabilizációját. A szennyezett talajokat kétféle eróművi pernyével, illetve lignittel, alginittel, mészhidráttal, nyersfoszfáttal és utóbbi négy adalékanyaggal együttesen kezeltük.

A talajokat 2 kg-os edényekbe helyeztük, a nedvességtartalmat a kapilláris víztartó képesség 60%-ának megfelelő értékre állítottuk be. A különböző koncentrációkban stabilizálószerrel kezelt mikrokozmoszok speciális termosztát-szekrényében kerültek elhelyezésre. A kísérlet nyomon követéséhez bizonyos időközönként az inkubált talajmintákból homogenizálás után mintát vettünk.

A szennyezőanyag kockázatának jellemzését két oldalról közelítettük. Kémiai analitikai módszerekkel vizsgáltuk a talajban a fémek mozgékonyágát, transzportját, biológiai felvehetőségét: az összes fém-tartalmat királyvizes feltárással, a növények számára hozzáférhető fém-tartalmat Lakanen-Erviö kivonattal, a mobilis fém-tartalmat acetátos kivonattal, és a vízoldható fém-tartalmat pedig vizes kivonattal.

A szennyezett talajok és más komplex mátrixú és összetett szennyeződésű szilárd fázisú minták esetében a kémiai-analitikai módszerekkel kapott eredmények környezeti realitása kicsi, ezért közvetlenül is szeretnénk volna mérni a talajban található fémek biológiai szervezetekre gyakorolt hatását és felvehetőségét, azaz az akut toxicitást és a biokoncentrációt. Párhuzamosan a kémiai analitikai eljárásokkal a talajok kémiai stabilizációját bakteriális és növényi toxikológiai tesztekkel követtük. A bakteriális tesztek közül a *Vibrio fischeri* lumineszcencia gátlási tesztet és az *Azotobacter agile* dehidrogenáz enzimaktivitás gátlási tesztet alkalmaztuk, növényi teszthez *Sinapis alba*-t (fehér mustárt) használtunk. Egy új, kifejlesztett tesztmódszerrel a fémek felvehetőségét, bioakkumulációját vizsgáltuk.

⁴¹ Csáki F.; Gruiz K.; Horváth Zs.; Márton P.; Puzder T. és Sajgó Zs. (2003): Kármentesítési kézikönyv 4. Kármentesítési technológiák, Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium

⁴² Vangronsveld, Colpaert and Van Tichelen (1996) Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physico-chemical and biological evaluation of durability of soil treatment and revegetation, *Environmental Pollution* (94) No. 2, pp. 131-140

⁴³ Simon László (2004) Fitoremediáció, BME OMIKK, Budapest, Környezetvédelmi füzetek, 2004. április

⁴⁴ Vangronsveld, Streckx, Van Assche and Clijsters (1995) Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping ground: effects of revegetation and metal immobilization by beringite. *Journal of Geochemical Exploration* (52) 221-229

⁴⁵ Vangronsveld, Van Assche, Clijsters (1995) Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution* (87) 51-59

1.2.4. Ökotoxikológiai és géntoxikológiai módszerek szennyezett talajok tesztelésére

1.2.4.1. Nitrifikációs gyorsteszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére

A talajok nitrifikáló aktivitását vizsgáló módszer a nitrifikáló baktériumok aktivitását méri, azaz a szerves nitrogénből oxidációval keletkezett ammóniát milyen mértékben oxidálják nitritté, majd nitráttá. A nitrifikáló aktivitás azonban toxikus vegyi anyagok jelenlétében csökken.

Egyre több kutató alkalmazza a nitrifikáló aktivitás mérését egyéb ökotoxikológiai teszttel azonos időben különböző szennyezőanyagok toxikus hatásának kimutatására. Robbanószeres toxikus hatásukat vizsgálták a szennyezett talajok nitrifikációs aktivitására^{46,47}; kísérleteikben már kis koncentrációban is jelentős aktivitás csökkenést figyeltek meg. Növényvédő szerekkel mesterségesen szennyezett talajok hatásukat vizsgálták a nitrifikáló aktivitásra⁴⁸. Továbbá szerves anyagok (metanol, antracén, fenantrén) és toxikus fémek (Cd, Cu, Zn, Pb) okozta nitrifikáló aktivitás csökkenést mértek, miközben a szennyező anyagok hatásukat vizsgálták a talajmikroflóra működésére^{49,50}.

Célunk a nitrifikáló aktivitást kihasználva egy új gyors (3-5 óra időtartamú) ökotoxikológiai módszer kidolgozása. Már hazánkban is létező nitrifikáló aktivitást mérő szabvány (MSZ ISO 14238, 2004)⁵¹, nem felel meg egy ökotoxikológiai gyorstesztnek, hiszen 28 napos inkubációs időt igényel.

Módszerfejlesztés

Három potenciális nitrifikáló aktivitást mérő módszert hasonlítottunk össze - Torstensson által javasolt 6 órás tesztet⁵², Berg és Rosswall által ajánlott 5 és 24 órás tesztet⁵³ - annak érdekében, hogy kiválasszuk azt, amely leginkább alkalmas egy ökotoxikológiai gyorsteszt továbbfejlesztésére. Mind a Torstensson 6 órás, mind a Berg és Rosswall 5 órás teszt indításakor plusz ammóniaforrással kell kiegészíteni a talajmintákat, a két módszer között a fő különbség a mintavételek gyakoriságában van. Ugyanakkor Berg és Rosswall 24 órás tesztben nincs a talajban plusz ammóniaforrás, a nitrifikáló baktériumok a talajban lévő ammónia oxidálására vannak ösztönözve. A három teszt közül 8 talajminta nitrifikáló aktivitását megmérve (**8. számú melléklet 8.1. táblázat**) a Berg és Rosswall 5 órás tesztjét választottuk és fejlesztettük tovább.

A teszt optimalizálása érdekében vizsgáltuk az inkubációs idő, a nedvességtartalom, a hőmérséklet és a rázatás hatását a nitrifikáció sebességére. Az eredményeket alapul véve az 5 óra inkubációs idő alatt 28°C-n 220 rpm-n rázatott talajok nitrifikáló aktivitását mérjük a módszerrel.

A módszerfejlesztés során végzett kísérletek eredményeit a **8. számú melléklet** tartalmazza.

Ökotoxikológiai módszer kidolgozása talajra nitrifikációs vizsgálat alapján

A tesztben a tesztorganizmus egy szennyezetlen, jó fizikai kémiai tulajdonságokkal rendelkező talaj, melynek állandó, nagy nitrifikáló aktivitása káros hatások következtében csökken. A tesztorganizmus megválasztásához több területről vettünk mintát és hasonlítottuk össze. A nitrifikáló aktivitás mellett

⁴⁶ Gong, P., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I. (2001) Ecotoxicological effects of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine on soil microbial activities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (5), 947–951

⁴⁷ Robidoux, P.Y., Gong, P., Sarrazin, M., Bardai, G., Paquet, L., Hawari, J., Dubois, C. and Sunahara, G.I. (2004) Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (58) 300–313

⁴⁸ Monkiedje, A., Ilori, M.O. and Spittler, M. (2002) Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology & Biochemistry* (34) 1939–1948

⁴⁹ Barajas-Aceves, M., Vera-Aguilar, E. and Bernal, M.P. (2002) Carbon and nitrogen mineralization in soil amended with phenanthrene, anthracene and irradiated sewage sludge. *Biosource Technology* 85, 217–223.

⁵⁰ Hinojosa, M. B., García-Ruiz, R., Viñegla, B. and Carreira, J.A. (2004) Microbial rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Soil Biology & Biochemistry* (36) 1637–1644

⁵¹ MSZ ISO 14238 (2004) Talajminőség. Biológiai módszerek. A nitrogénmineralizáció és a nitrifikáció meghatározása talajban, valamint a vegyi anyagok ezen folyamatokra gyakorolt hatása

⁵² Torstensson, L. (1994) „Ammonium oxidation, a rapid method to estimate potential nitrification in soils”. Mats Guideline - Test 04. In: Torstensson, L. (Ed.) Guidelines. Soil Biological Variables in Environmental Hazard Assessment. GEO tryckeriet, Uppsala University, Uppsala, 40–47.

⁵³ Berg, P. and Rosswall, T. (1985) Assay of nitrification (short-term estimations). In: Alef, K., Nannipieri, P., (Eds.) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London, Great Britain, 241–243

mértük a talajok egyéb fizikai-kémiai tulajdonságait is. Egy kerti talaj felelt meg a fenti követelményeknek.

Következő lépésként a teszt érzékenységének meghatározására szennyeztük a talajt különböző koncentrációban toxikus fémekkel (Zn, Cu, Ni, Co, Ba, Pb, Mo, Cd) és szénhidrogénnel (Diesel olajjal, transzformátorolajjal, és háztartási tüzelőolajjal). A szennyezett és a kontroll talajban mért nitrifikáló aktivitások értékeiből százalékos gátlást számítottunk. A %-s gátlásokat ábrázoltuk a szennyezőanyagok koncentrációinak függvényében és a koncentráció-válasz görbéről leolvastuk az egyes szennyező anyagok toxikus hatását jellemző EC₂₀ és EC₅₀ (20 ill. 50 %-os gátlást okozó koncentráció) értékeket.

Az érzékenységi sorrend a fémek esetében a „B” szennyezettségi határértéket figyelembe véve a következő: *Cink* > *Réz* > *Nikkel* > *Kobalt* > *Kadmium* > *Bárium* > *Ólom*, *Molibdén*

A teszt érzékenysége a szénhidrogénekre: *Diesel olaj* > *Háztartási tüzelőolaj* > *Transzformátorolaj*

Érzékenységi kísérleteink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk kifejlesztett nitrifikációs aktivitás gátlást mérő teszt akut tesztként alkalmazható szennyezett talajok toxicitásának jellemzésére, s méltó helyet foglal az egyéb már szabványosított talajt vizsgáló ökotoxikológiai tesztek között.

1.2.4.2. *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlási teszt szennyezett talajok környeztoxikológiai tesztelésére

A *Tetrahymena pyriformis* az eukarióta egysejtűek közé tartozó vízben élő protozoa. Baktériumfaló, de elhalt állati eredetű anyagokat és detrituszt is fogyaszt. Mivel vizes közegből veszi fel a táplálékát, így vízben oldódó szennyezőanyagok közvetlenül hathatnak normális életműködésére, illetve szaporodási ciklusára. Számos kutató tanulmányozta ezt a fajt, hiszen fenntartása könnyű, vizsgálata nem költséges, s gyorsan szolgáltat eredményt.

Különböző szerves anyagok (PAH-vegyületek, alkoholok, anilinek) a *Tetrahymena pyriformis*-ra gyakorolt toxikus hatását mutatták ki vizes közegben^{54,55,56}.

Vargha (2001)⁵⁷ szerves és szervetlen anyagokkal, valamint különböző hulladékkivonatokkal végzett ökotoxikológiai vizsgálatokat. Bár már számos kutatócsoport kifejlesztett ökotoxikológiai teszt módszert vizes közegben, szabványosított formája még nem létezik.

Szennyezett talajok kontakt tesztelésére nincs olyan módszer, mely e trófikus szintet képviselő tesztorganizmust alkalmazná. A tesztorganizmus, a szennyezőanyagokra való nagy érzékenysége miatt reményeink szerint szennyezett talajok direkt kontakt vizsgálatára is alkalmazható. Ugyanakkor az állati tesztorganizmusokat alkalmazó ökotoxikológiai tesztekhez képest (akut vizsgálat tesztelési ideje általában 2 hét) e tesztorganizmus vizsgálata sokkal rövidebb időt vesz igénybe, hiszen szaporodási ciklusa tenyésztési körülményektől függően pár óra alatt eléri a stacioner fázist.

Módszerfejlesztés

Célunk olyan talaj direkt kontakt teszt kidolgozása volt e tesztorganizmust alkalmazva, mellyel kiegészíthetők a szennyezett talajt vizsgáló kontakt állati és mikrobiális tesztek.

Kutatási munkánk során olyan új kontakt ökotoxikológiai tesztet fejlesztettünk ki, melyben a tesztorganizmusként alkalmazott *Tetrahymena pyriformis* protozoa szaporodás gátlását vizsgáljuk szennyezett talajok szuszpenziójában. A módszerfejlesztés eredményei táblázatos formában, ill. diagramokon a **9. számú mellékletben** láthatók.

⁵⁴ Schultz, T.W. (1997) Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint – A surrogate for fish lethality. *Toxicological Methods* 7, 289–309

⁵⁵ Sauvart, M.P.; Pepin, D.; Piccini, E. (1999) *Tetrahymena pyriformis*: A tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere* 38, 1631–1669

⁵⁶ Bonnet, J.L.; Dusser, M.; Laffose, J.; Bohatier, J. (2003) Effect of One Environmental Pollutant, Anthracene Towards a Freshwater Ciliated Protozoan: *Tetrahymena pyriformis*. The Journal of Eukaryotic Microbiology 41st Annual Meeting

⁵⁷ Vargha, B. (2001) Ökotoxikológiai vizsgálatok *Tetrahymena pyriformis* egysejtű tesztel, *Egészségtudomány* 45, 151–158

A kísérleti munka lépései

1. Felvettük a tesztorganizmus szaporodási görbáját. Az aktuális sejtkoncentráció meghatározására kipróbáltuk a mikroszkópos meghatározást, az elektronikus részecskeszámlálót és optikai denzitás mérését fotometriás úton. A legmegbízhatóbb módszernek a mikroszkópos sejtszámlálás bizonyult.
2. Vizsgáltuk a tesztorganizmus érzékenységét szennyezőanyagokra életciklusa folyamán, kezdetben talajt nem tartalmazó oldatokban. Kísérleteinkből kiderült, hogy a fiatal tenyészetek érzékenyebben reagálnak a szennyezőanyagokra, mint az 5–7 naposak.
3. Az alkalmazott tesztközeg optimális mennyiségének és a rázatás hatásának megállapítására, újabb vizsgálatokat indítottunk. 2 ml illetve 5 ml tápoldatot tartalmazó tesztcsövekben vizsgáltuk a szennyezőanyagok hatását az egysejtű szaporodására rázatás nélkül, illetve 200 rpm-n rázatás mellett. Az eredmények alapján a további kísérleteinkben 5ml, rázatott tesztközegben tenyésztett egysejtűeket alkalmaztunk.
4. Szennyezetlen, kontroll talajként az OECD talajt, a kvarchomokot és egy szennyezetlen kerti talajt vizsgáltunk. A kerti talajban volt a legnagyobb a fajlagos szaporodási tényező (9,21), míg a kvarchomokban 7,42, az OECD-ben 6,86. A rázatás hatását is megvizsgáltuk. 200, 300, 350 és 400 rpm fordulatszámom követtük a tenyészet szaporodási sebességét a kontroll talaj szuszpenzióban. 400 rpm-nél szaporodtak a leggyorsabban az egysejtűek.
5. Vizsgáltuk szennyezett talajok hatását az egysejtűre. Mesterségesen szennyeztünk talajt nehézfémekkel (Cu, Cd, Pb, Zn) és szerves szennyező anyagokkal (pakura, transzformátor olaj). A vizsgált szennyező anyagokra a tesztorganizmus érzékenynek bizonyult, a szennyezett talajminták toxikus hatást mutattak. A szennyezett és a kontroll talajban meghatározott fajlagos szaporodási tényezők értékeiből százalékos gátlási értékeket számítottunk.

A fenti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy sikerült kidolgoznunk egy olyan direkt kontakt tesztet, mely alkalmas mind nehézfémek, mind szerves szennyezőanyagok toxikus hatásának kimutatására talaj szuszpenzióban. A teszt időtartama 3 nap, így ez a módszer sokkal rövidebb időt vesz igénybe, mint az állati tesztorganizmusokat alkalmazó eljárások.

1.2.4.3. Nematoda (Panagrellus redivivus) mortalitási teszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére

A *Panagrellus redivivus* a Nematoda törzsbe tartozó, talajban, rothadó anyagokon élő fonálféreg. Különböző vegyi anyagok *Panagrellus redivivus*-ra kifejtett káros hatását tanulmányozták. Számos irodalom szól nehézfémek, fenolok, s egyéb peszticidek e tesztorganizmusra gyakorolt akut és krónikus hatásának vizsgálatáról vizes közegben^{58,59,60,61}.

A standardizált talajt vizsgáló tesztek állati tesztorganizmusai generációs ideje viszonylag hosszú (2–4 hét)^{62,63}, míg ennek a fajnak tenyésztési körülményektől függően 4–7 nap, mely kielégíti az ökotoxikológiai tesztekkel szemben fenntartott másik követelményt, a tesztelés gyorsaságát.

Standardizált módszer, mely ezzel a tesztorganizmussal vizsgálja a szennyezett talajok, illetve talajvizek káros hatását, ma még nem létezik. Célunk talaj direkt kontakt ökotoxikológiai teszt kidolgozása,

⁵⁸ Debus, R. and Niemann R. (1994) Nematode test to estimate the hazard potential of solved contaminations. *Chemosphere* (29) 611-621

⁵⁹ Castillo, G. and Schäfer, L. (2000) Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: A Chilean experience. *Environmental Toxicology* (15) 331-337

⁶⁰ Achazi, R.K. (2002) Invertebrates in risk assessment, development of a test battery and of short term biotests for ecological risk assessment of soil. *Journal of Soils and Sediments* (2) 174-178

⁶¹ Boyd, W.A. and Williams, P.L. (2003) Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* (11) 2768-2774

⁶² International Office of Standardisation (ISO/TC 190SC4 WG2), Soil Quality – Effects of soil pollutant on *Collembola (Folsomia candida)* – Method for determination of effects on reproduction

⁶³ Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) (1984) OECD Guidelines for testing of chemicals, Guideline 207, Earthworm acute toxicity tests, OECD, Paris, France

melyben végpontként mind a túlélést, mind a reprodukciót alkalmazhatjuk. Az értékelés mikroszkóp segítségével történik egyedszámlálással.

A módszer kidolgozásához az OKI-ban alkalmazott nem szabványosított módszert vettük alapul. Az említett eljárás a szennyezett talajok toxicitását a *Panagrellus redivivus* tesztorganizmusra talajkivonat formájában vizsgálja, mikrotitrátor lemezekben. Az OKI teszt esetén a vizsgálat időtartama 2 hét, a kiértékelés félkvantitatív, és a reprodukciót nem határozzák meg mennyiségileg. Kutatócsoportunk a módszerfejlesztés első lépéseként az alapló módszert optimalizálta:

- A vizsgálati időt lerövidítettük: kísérleteink alapján 1 hét inkubációs idő is elég az eredetileg 2 hetes inkubációs periódus helyett az eredmények értékeléséhez,
- A kiértékelést kvantitatívvá tettük,
- Értékelésnél a mortalitást és reprodukciót (szaporodásgátlást) is vizsgáljuk.

A módosításokkal az eljárás rövidtávú (akut) és hosszútávú hatások becslésére is alkalmassá vált. Az eredményeket (a tesztelési végpontként) ennél a módszernél is a koncentráció-hatás görbe alapján, statisztikai úton meghatározott LC₂₀, LC₅₀ (20 ill. 50 %-os letalitást okozó koncentráció) és EC₂₀, EC₅₀ értékek formájában adtuk meg.

Miután kialakult a talajkivonatos teszt végleges menete, első lépésként kísérleteket indítottunk a fonálféreg érzékenysége vizsgálatára a következő nehézfémekkel: Cu, Zn, Cd, Ni, Pb. Az ólomra egyáltalán nem voltak érzékenyek a tesztállatok, a másik négy nehézfém esetén a következő érzékenységi sorrendet kaptuk: $Cd > Cu > Ni > Zn$.

A fémekkel végzett vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a határérték kisebb annál a koncentrációnál, mint ami érzékelhető hatást fejt ki a fonálféregre. Ez is indokolja a kontakt, szilárd fázisú teszt szükségességét.

A kivonattal végzett tesztelés után elkezdjük a direkt kontakt módszer kifejlesztését a teljes talaj vizsgálatára. Többféle lehetőséget is kipróbáltunk a szilárd fázisú minták tesztelésére: mikrotitrátor lemezen, extrakciós csőben és kémcsőben. A módszer kidolgozása folyamatban van.

1.2.4.4. Ames-teszt szennyezett talajok mutagén hatásának jellemzésére

Napjainkban egyre szélesebb körben alkalmaznak géntoxikológiai tesztek környezeti minták, köztük talajminták mutagén hatásának vizsgálatára.

A helyspecifikus kockázatfelmérést támogató talajvizsgálati módszeregyüttesünket bővítjük egy, a talaj direkt tesztelésére is alkalmas géntoxikológiai eljárással.

A módszer kiválasztásához munkánk első részében áttekintettük és feltérképeztük a témában rendelkezésre álló irodalmat. A vegyi anyagok mutagén aktivitásának becslésében a következőket kell figyelembe venni: genetikai végpontok, vagyis a tesztmódszerben detektálható génmutációk, strukturális vagy számbeli kromoszóma-változások; különböző típusú anyagokra való érzékenység; egyes genetikai végpontok meghatározására használt különböző tesztmódszerek száma; az eredmények egyenletességének biztosíthatósága a különböző tesztek és tesztorganizmusok esetében; a dózis-válasz kapcsolat meghatározása és a vizsgálatok megfelelése a szabványosított módszereknek⁶⁴.

Az elmúlt tíz évben rohamosan nőtt a kereskedelemben elérhető géntoxicitási tesztek alkalmazása illetve továbbfejlesztő laboratóriumok száma. A Belgiumban megrendezésre került Technotox workshop-on 14 géntoxikológiai tesztet alkalmaztak és hasonlítottak össze egyidejűleg 11 minta – köztük tiszta vegyi anyagok és környezeti minták – vizsgálatára⁶⁵. A nemzetközileg is elismert, elfogadott és széles körben alkalmazott Ames tesztet⁶⁶ és az UMU tesztet (ISO 13829)⁶⁷ a többi módszerrel párhuzamosan alkalmazták, és referenciaként szolgáltak. Az alkalmazott módszerek között 6 prokarióta teszt, 1 élesztőgomba teszt, 4 emlős teszt, 1 DNS és 1 bakteriális teszt volt.

⁶⁴ U.S. Environmental Protection Agency - Guidelines for Mutagenicity Risk Assessment 1986, Federal Register 51(185):34006-34012 Risk Assessment Forum, Washington, DC

⁶⁵ Corbisier, P.; Hansen, P.D. and Barcelo, D. (Ed) (2000) Proceedings of the BIOSSET Technical Workshop on Genotoxicity Biosensing, May 8-12, 2000 VITO Flemish Institute for Technological Research, Belgium

⁶⁶ Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* (113) 173-215

⁶⁷ UMU ISO 13829 (2000) Water-quality determination of the genotoxicity of water and wastewater using umu-test.

A talaj szennyezőanyagainak mutagén hatását jelenleg leggyakrabban a talajok vizes kivonataiból tesztelik^{68, 69}. Az irodalom áttanulmányozása után az AMES-teszt alkalmazása mellett döntöttünk. A módszer alkalmazásával, vizsgálatával kapcsolatban is nagy számban állnak rendelkezésre irodalmak. Az Ames vagy *Salmonella* tesztet kifejlesztőjéről Amesről (Ames, 1975)⁷⁰ nevezték el. A módszer hisztidin auxotróf *Salmonella typhimurium* törzset használ, amely mutagén hatásra elveszti auxotróf jellegét. A módszert eleinte csak vegyi anyagok karcinogén hatásának tesztelésére alkalmazták, a későbbiekben környezeti minták vizsgálatára is.

A vizsgálat során többszörös mutáns *Salmonella typhimurium* törzseket alkalmazunk, mint indikátor organizmusokat. A kémiai anyagok metabolikus aktivációjára enziminducerral kezelt patkányok májából készített sejtkivonatot (mikroszóma frakció) használunk, melyet kiegészítünk a NADPH generáló rendszerrel (S9 mix). A baktériumtörzsek a hisztidin bioszintéziséért felelős operon valamelyik strukturgénjében előidézt mutáció miatt hisztidin nélkül nem képesek szaporodni az adott közegben. Mutagének hatására a populáció egy része visszanyeri az elvesztett tulajdonságot reverz mutáció révén, azaz képesek lesznek hisztidin mentes táptalajon is szaporodni.

Az Ames-teszt esetében is vizes kivonatokot alkalmaznak a talaj szennyezőanyagok mutagén hatásának vizsgálatára. Célunk a módszer kidolgozása szilárd fázisú minták vizsgálatára.

Kísérleti munka

Kísérleti munkánk első fázisában a szennyezett talajok (pakurával, transzformátor olajjal) extraktumainak (diklór-metán/ciklohexán oldószerekkel) mutagén hatását teszteltük a módszerrel.

A teszt során a tesztelendő anyag oldatát, az egyes baktérium törzsek szuszpenziós tenyészetét és a májpreparátumot bekeverjük egy nyomokban hisztidint tartalmazó felolvasztott lágyagarba. Rárétegezzük a csak szervesen sókat és szén- valamint energiaforrást (glükózt) tartalmazó minimál agar táptalajra Petri-csészébe. A lágyagarban lévő kevés hisztidin csak néhány osztódást enged meg. A hisztidin kifogyása után már csak a visszamutálódott (revertált) baktériumok tudnak tovább szaporodni, így kétnapi inkubáció után már szabad szemmel is felismerhető kolóniákat alkotnak.

Értékelés során a kezelt lemezekon talált mutáns/revertáns kolóniák számát összevetjük a kezeletlen lemezekon talált spontán mutáns/revertáns kolóniák számával. Mutagének hatására dóziszfüggő kolóniaszám emelkedés figyelhető meg.

A vizsgálatot az extraktumokból végeztük a TA100 és a TA98 törzssel, egyidejűleg metabolikus aktivációval (S9 mix) illetve anélkül (pufferrel). Az eredmények értékelése 72 óra elteltével a lemezenként kolóniaszámlálás után statisztikai analízissel történt.

A TA100-as törzsszel végzett kísérletek eredményei alapján sem a pakurával, sem a transzformátor olajjal szennyezett talaj kivonata nem minősíthető sem toxikusnak, sem mutagének mivel nem figyelhető meg kolóniaszám emelkedés a kontrollhoz viszonyítva, sem S9 jelenlétében, sem S9 nélkül. A TA98 törzsen az S9 jelenléte nélkül végzett kísérletben mindkét szennyezőanyag esetén kisebb mértékű kolóniaszám emelkedés figyelhető meg. Ez alapján csak gyenge mutagén hatást állapíthatunk meg. Az aktivációs rendszer hozzáadásával sem figyelhető meg jelentős kolóniaszám emelkedés. Összefoglalva a tesztek során kapott eredményeket megállapíthatjuk, hogy egyik szennyezett talaj kivonata sem mutatott mutagén hatást a tesztorganizmusokra.

A továbbiakban célunk a módszer továbbfejlesztése olyan módon, hogy a kivonatok helyett a teljes talajt vizsgáljuk. Kísérleteket tervezünk a szennyezett talaj mutagén hatásának jellemzésére a tesztelendő teljes talaj agarba keverésével, illetve talaj-agar korongok alkalmazásával.

⁶⁸ Dechema (1995) DECHEMA-Fachgesprache Umweltschutz (1995) Bioassays for soil, In: 4th Report of the Interdisciplinary DECHEMA Committee „Environmental Biotechnology-Soil” and Ad hoc Committee „Methods for toxicology/Ecotoxicological Assessment of Soils”, Eds.:Kreysa, G., Wiesner, J. DECHEMA, Frankfurt am Main.

⁶⁹ Ehrlichmann, H., Dott, W. and Eisentraeger, A. (2000) Assessment of the water-extractable genotoxic potential of soil samples from contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (46), 73-80

⁷⁰ Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutat.Res.* (31):347-364.

1.2.5. Laboratóriumi mikrokozmoszok

Az eltérő célú és méretű mikrokozmoszok osztályozását és kivitelezésükre vonatkozó módszertani útmutatót elkezdtek összeállítani. A fő mikrokozmosztípusok, melyekhez módszertant készítenek az alábbiak: átlevégőztetett oszlopreaktor, átfolyósos oszlopreaktor, nyitott stabilizációs és biodegradációs mikrokozmosz (tartályreaktor), zárt biodegradációs és toxicitásmérő mikrokozmosz. A mikrokozmoszokat méret, elrendezés, és a folyamatok követéséhez szükséges mintavételi és minta-elemzési módszerek szerint is osztályozzuk és értékeljük.

1.3. Laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek tervei a kidolgozott módszerek alkalmazására

A kísérletek egy része a fémek mozgékonyságának, biológiai hozzáférhetőségének jellemzését, a kezelések hatására bekövetkező változások követését célozza.

Ezek egyik fajtája az ún. stabilizációs mikrokozmosz, mely a kémiai és fitostabilizációs talajremediáció gyakorlati fejlesztését alapozzák meg. A kémiai stabilizálószeres rövid- és hosszútávú hatásának vizsgálatára használjuk fel a kidolgozott mikrokozmosz technikát és a folyamatok követésére a TalajTesztelőTriádot, és azon belül a talajra kidolgozott direkt kontakt tesztek.

A másik, – a fémek mozgékonyságával összefüggő – a fémek mobilizálását és kioldását vizsgáló mikrokozmosz kísérlet, amely a különböző módon immobilizált fémeket tartalmazó talajok átszivárgó vízzel szembeni stabilitását, fémvisszatartását vizsgálja. A kísérlet követése kémiaival kombinált toxikológiai teszttel fog történni, elsősorban a folyékony fázis, a csurgalék vizsgálatán keresztül.

A szerves talajszennyezőanyagok mozgékonyságával összefüggő jellemzőket is mikrokozmoszban jellemezzük, kombinált fizikai-kémiai és toxikológiai módszerekkel követve.

A szerves szennyezőanyagok állatok/ember általi emésztésének feltáró hatását modellezzük többlépcsős emésztőenzimes kezeléssel és más egyszerűbb, de hasonló feltáródást, illetve Kow eltolódást eredményező kezelésekkel. Mindkét előkezelési módszer toxicitási tesztekre gyakorolt hatását vizsgáljuk első lépésben.

A mikrokozmoszok terve és összeállítása a modellezendő folyamatok ismeretében történik.

A mikrokozmoszok terve 10 kísérletsorozatot foglal magába, összesen mintegy 150 stabilizációs és kioldási kísérletet toxikus fémekkel szennyezett talajokra és kb. 100 mikrokozmoszt szerves szennyezőanyagok megoszlásának, kémiai és biológiai hozzáférhetőségének és biodegradációjának vizsgálatára.

A metodikailag kidolgozott, előkészített és elindított kísérletsorozatok az alábbiak voltak:

Toxikus fémek mobilitásának, hozzáférhetőségének, növényi felvehetőségének, kiodhatóságának vizsgálatára ún. „stabilizációs” és „kioldási” mikrokozmoszokat terveztünk és indítottunk. A stabilizációt és a biológiai kioldást modellező talajmikrokozmoszok kivitelezésére vonatkozó metodikát több méret összehasonlítása után fejlesztettük ki, jelenleg az alkalmazásokon és a kioldási mikrokozmosz továbbfejlesztésén, a rövid- és hosszútávú kioldás gyors meghatározásán és a mikrokozmoszok integrált metodikát alkalmazó követésén dolgozunk. Valós szennyezett területekhez és problémákhoz kötődő kísérletek eredményét kockázatfelméréshez és technológiatervezéshez is fel lehet használni.

Toxikus szerves szennyezőanyagok biológiai hozzáférhetőségét befolyásoló adalékok, előkezelések vizsgálatára alkalmas talajmikrokozmoszok valamint a folyamatok követésére alkalmas mintavétel és vizsgálati módszeregyüttes terve és elindítása megtörtént.

A Kow és biodegradáció összefüggéseit és a biodegradáció befolyásolását ciklodextrines kezeléssel ún. biodegradációs mikrokozmoszban vizsgáljuk. A biodegradálható frakció meghatározása mikrokozmosz kísérleteket terveztünk mesterségesen szennyezett talajokkal és szerves szennyezőkkel szennyezett területekről származó talajokkal.

Az oktanol-víz és talaj-víz megoszlási hányados (Kow és Kd) meghatározása mikrokozmoszokat terveztünk mesterségesen szennyezett talajjal és szerves szennyezőanyagokkal szennyezett területekről származó talajokkal. A megoszlásban bekövetkező változások követésére és modellezésére ciklodextrint alkalmaztunk, melynek hatását vizsgáljuk a megoszlásra.

A humán expozíció becslésére az emésztés hatásának modellezésére, és az emésztés feltáró hatásának összehasonlító vizsgálatára alkalmas mikrokozmosz tesztek tervezésének előkészítését elvégeztük.

MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: A kockázatelemzés folyamatábrája, a területhelyspecifikus kockázatelemzés két oldalát támogató mérések

PEC JELLEMZÉSÉT TÁMOGATÓ MÓDSZEREK

Fizikai-kémiai módszerek

a szennyezőanyag és a környezet együttes jellemzésére

Szennyezőanyagok mennyiségi és minőségi analízise

- Szerves szennyezőanyagok kioldása (apoláros, poláros oldószer ill. keverék)
- Fémek különböző kivonási eljárásai
 - Királyvíz – összes fémtartalom
 - Lakanen-Erviö – növény által felvehető
 - Acetátos – mobilis fémtartalom
 - Szekvenciális extrakció

Megoszlási hányadosok (Kd, Kp, Koc, Kow) meghatározása

PNEC JELLEMZÉSÉRE SZOLGÁLÓ MÓDSZEREK

Biológiai és ökotoxikológiai módszerek

a szennyezőanyag hatásának felmérésére

- Talaj mikroflóra mennyiségi, minőségi jellemzése, diverzitás
- Szennyezőanyagot tűrő, bontó sejtek koncentrációja
- Enzimaktivitások meghatározása
- Biodegradációs tesztek
- Bioakkumulációs tesztek
- Direkt kontak toxicitási tesztek (bakteriális, növényi, állati)
- Mutagenitási tesztek

Kibocsátás (forrás)

transzport

PEC (Predicted Environmental Concentration)

Előre jelezhető környezeti koncentráció

Hatás (NOEC)

extrapoláció

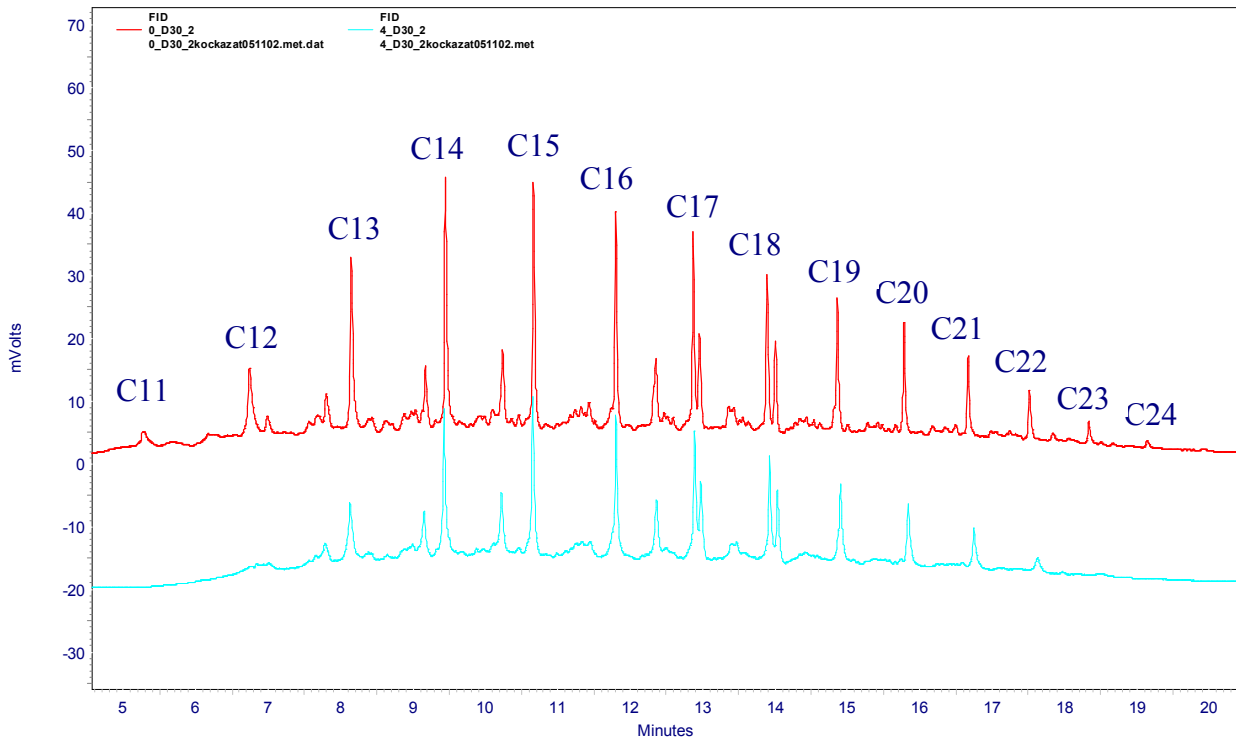
PNEC (Predicted No Effect Concentration)

Előre jelezhetően károsan még nem ható koncentráció

RQ (Risk Quotient) = kockázati tényező

$$RQ = PEC/PNEC$$

2. számú melléklet: Dízelolajjal szennyezett talajok extraktumainak gázkromatográfiás vizsgálata



2.1. ábra. 30000 ppm dízelolajjal szennyezett talajminták extraktumainak kromatogramja a kísérlet kezdetén (piros) és 4 hét után (kék)

2.1. táblázat. A biodegradáció mértékét jelző arányszámok dízel olajra és a szennyezett talaj extraktumaira

		$n\text{-C}_{17}\text{H}_{36}$ /prisztán	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ /fitán	prisztán/fitán
		Dízel olaj	$1,97 \pm 0,03$	$1,70 \pm 0,13$
30 000 ppm dízelolaj szennyeződés	Talajminta 0. hét	2,19	1,86	1,03
	Talajminta 2. hét	2,19	1,74	0,95
	Talajminta 4. hét	1,85	1,50	0,99
15 000 ppm dízelolaj szennyeződés	Talajminta 0. hét	1,69	1,55	1,12
	Talajminta 2. hét	1,53	1,43	1,04
	Talajminta 4. hét	1,33	1,17	1,04

Az arányok csökkenése a biodegradáció mértékének előrehaladását jelzi.

3. számú melléklet: K_{ow} meghatározása, ciklodextrinek hatása a megoszlásra

A K_{ow} meghatározása kísérleti úton

2 ml n-oktanolt, 2 ml desztillált vizet és 25 μ l vendégmolekulát kémcsövekbe mérünk és lezárjuk. A kémcsöveket folyamatosan rázatjuk 30 percen át és egy éjszakán át állni hagyjuk. Azután mind a szerves, mind pedig a vizes fázisból mintát veszünk. 200 μ l szerves fázishoz 200 μ l desztillált vizet adunk és egy másik edényben 200 μ l vizes fázishoz 200 μ l n-oktanolt adunk. A gőztéranalízishez használatos (19.5 ml) edényeket ezután 90°C termosztáljuk és 20 percig rázatjuk, majd 250 μ l gőzmintát veszünk analízisre. Az ugyanazon minta szerves ill. vizes fázisáról felvett kromatogramon az összetartozó területek aránya adja meg a megoszlási hányadost.

Kromatográfiás körülmények:

Gázkromatográf: Shimadzu GC-17A
Állófázis: HP-1 (13m×0,2mm×0,11 μ m)
Detektor: Lángionizációs detektor (FID)
Injektor: Shimadzu AOC-5000 automata injektor
Injektálási térfogat: 500 μ l
Split arány: 300:1.
Hőfok program: A kolonnát 50°C-on tartjuk 10 percig, majd 180°C-ra fűtjük 10°C/min-es felfűtési sebességgel, a szennyezések eltávolítása céljából 250°C-ra felfűtjük 25°C/min-os felfűtési sebességgel és 13 percig ezen a hőmérsékleten tartjuk.
Injektor hőmérséklete: 230°C
Detektor hőmérséklete: 230°C
Lineáris áramlási sebesség: 21 cm/sec

Az eddig vizsgált alkán, cikloalkán és benzol származékokat az Aldrich, Merck és Sigma finomvegyszer-forgalmazó cégektől szereztük be, mind gázkromatográfiás tisztaságúak voltak.

A K_{ow} meghatározása in silico módszerekkel

A logKow értékek becslésére hat programot használtunk: négy ezek közül a fragment módszeren alapul, a másik kettő a neurális hálózatok módszerét alkalmazza a becslésre.

A fragment módszerre épülő a CLOGP interneten hozzáférhető ingyenes verziójához (www.daylight.com) egy molekularajzoló program is tartozik, melynek segítségével a kémiai szerkezet alapján megkapjuk a SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) formulát, ami a fragmentumok segítségével írja le a molekulát. Ezeket a SMILES formulákat használtuk a többi programhoz is, így a KOWWIN demo programhoz is www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm. A bevezetésben felsorolt másik két fragment alapú programot (www.molinspiration.com és www.cheminfo.pku.edu.cn/calculator/xlogp) is használtuk összehasonlítás céljából.

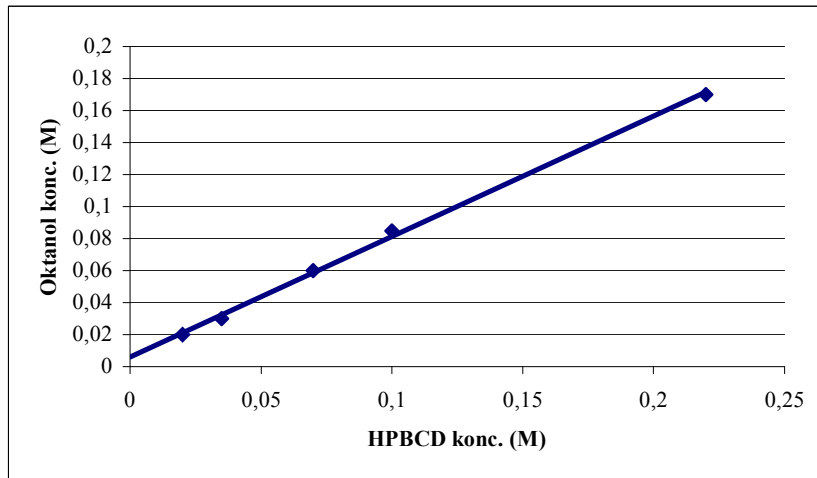
3.1. táblázat. A Kow értékek tiszta komponensekre (C6–C12 lineáris alkánokra, C0–C2-alkil-ciklohexánokra és C0–C2-alkil-benzolokra

	Mért érték	Számított						Irodalomban közölt mért érték	
		CLOGP	KOWWIN	miLOGP	XLOGP	IA LogP predictor	ALOGPS	LogPstar	Exp. database for K _{OW} WIN
hexán		3,87	3,29	2,90	3,75	3,84	4,02	3,90	3,90
heptán		4,40	3,78	3,33	4,32	4,31	4,33	4,66	4,66
Oktán		4,93	4,27	3,77	4,89	4,76	4,73	5,18	5,18
Nonán		5,46	4,76	4,20	5,46	5,23	5,24	Nincs adat	Nincs adat
Dekán		5,98	5,25	4,64	4,97	5,67	5,87	5,65	5,01
Undekán		6,51	5,74	5,07	5,33	6,15	5,96	6,54	Nincs adat
Dodekán		7,04	6,23	5,50	5,90	6,58	6,42	6,80	6,10
Ciklohexán	3,04±0,90	3,35	3,18	2,59	3,41	3,14	3,46	3,44	3,44
Metil-ciklohexán	3,1±0,23	3,87	3,59	2,96	3,92	3,64	3,90	3,61	3,61
Etil-ciklohexán	3,44±0,15	4,40	4,08	3,40	4,49	4,23	4,59	Nincs adat	4,56
Benzol	2,05±0,04	2,14	1,99	2,13	2,02	2,04	2,03	2,13	2,13
Toluol	2,34±0,02	2,64	2,54	2,45	2,46	2,66	2,56	2,73	2,73
o-Xilol	3,07±0,05	3,09	3,09	2,78	2,90	3,15	3,16	3,12	3,12
m-Xilol	3,06±0,08	3,14	3,09	2,78	2,90	3,21	3,15	3,20	3,20
p-Xilol	3,02±0,13	3,14	3,09	2,78	2,90	3,20	3,15	3,15	3,15
1,3,5-TMB	2,00±0,14	3,64	3,63	3,10	3,33	3,82	3,64	3,42	3,42
1,2,3-TMB	2,74±0,04	3,54	3,63	3,10	3,33	3,73	3,63	3,59	3,66
1,2,4-TMB	3,27±0,13	3,59	3,63	3,10	3,33	3,79	3,62	3,63	3,63
Etil-benzol	2.49±0.01	3,17	3,03	2,80	2,92	3,13	3,27	3,15	3,15
naftalin		3,32	3,17	3,42	3,29	3,40	3,33	3,30	3,30
1-metil-naftalin		3,82	3,72	3,74	3,72	3,96	3,83	3,86	3,86
antracén		4,49	4,35	4,71	4,55	4,65	4,55	4,45	4,45
monoklórbenzol		2,86	2,64	2,76	2,64	2,64	2,77	2,89	2,84
1,2-diklórbenzol		3,45	3,28	2,01	2,53	3,35	2,21	3,43	3,43

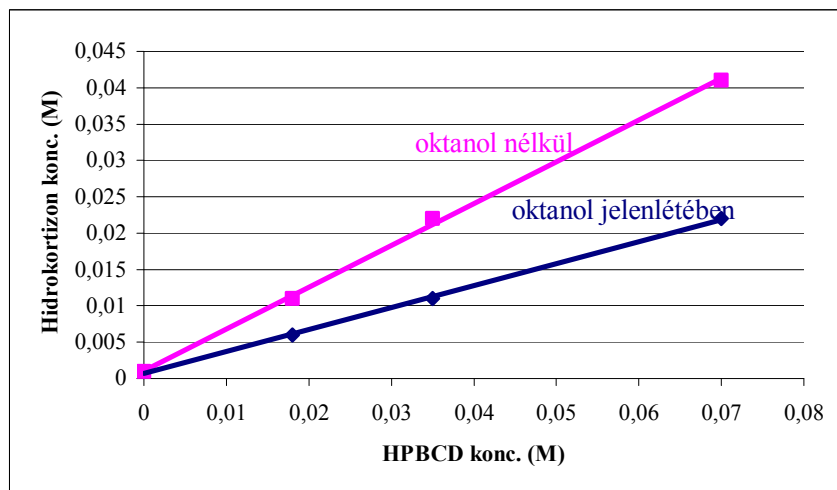
Különböző szoftverekkel a kémiai szerkezet alapján számított, saját mérések alapján számított és a szakirodalomban talált adatok összehasonlítása.

A CD hatása a Kow értékére

Az oktanol oldékonysága a vizes CD oldatokban a CD koncentrációval nő, mert komplex képződik (3.1. ábra). Az oktanol/CD komplex képződése kompetitív folyamat, ami a jelenlévő vendégmolekulák (pl. talajszennyezőanyag, gyógyszer) komplexálásának hatékonyságát rontja (3.2. ábra).

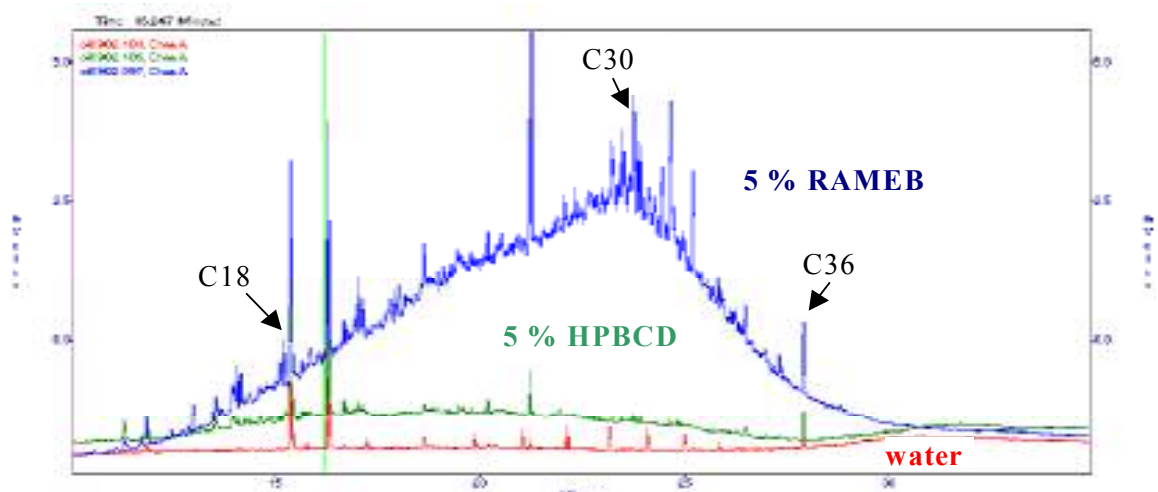


3.1. ábra Az oktanol oldékonysága vizes HPBCDoldatokban

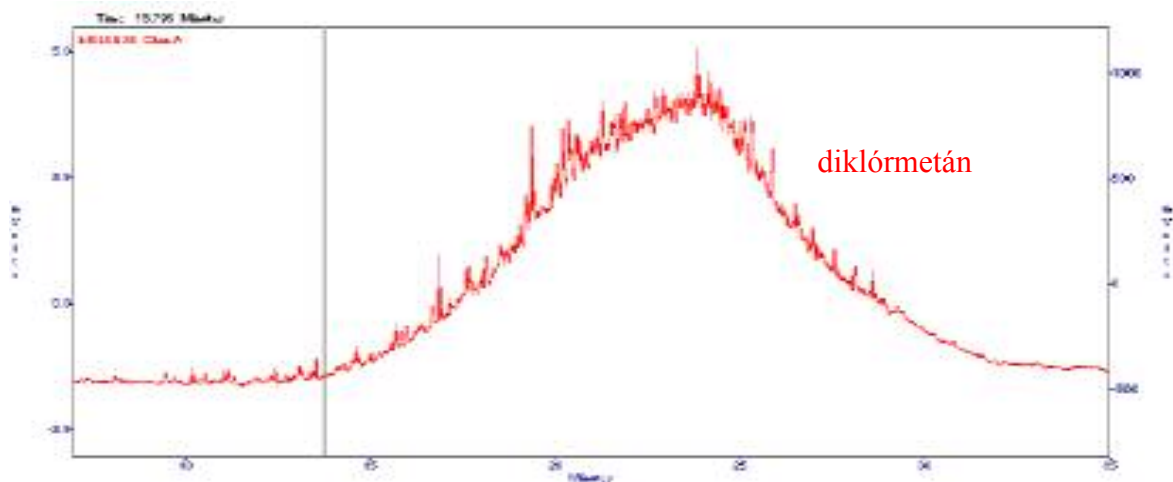


3.2. ábra A hidrokortizon modell vendégmolekula oldékonysága vizes CD oldatokban oktanol nélkül és oktanol jelenlétében.

4. számú melléklet: Extrakció különféle vizes ciklodextrin oldatokkal



4.1. ábra 10 000 ppm pakurával szennyezett talaj extrakciója vízzel és vizes CD oldatokkal (GC: 13 m x 0,22 mm x 0,11 µm HP-1 oszlop, 50°C 3 perc, 10°C/perc 315°C 10 perc)



4.2. ábra 10 000 ppm pakurával szennyezett talaj extrakciója szerves oldószerrel (a kromatográfiai körülmények azonosak a 4.1. ábrával)

4.1. táblázat A CD oldatos extrakció hatékonysága a szerves oldószeres extrakcióhoz képest (10 000 ppm pakurával szennyezett talaj egyszeri extrakciója 5g talaj/10 ml diklórometán vagy 5 g talaj/100 ml vizes CD oldat a vizes extraktum extrakciója 10 ml diklórometánnal)

Extrahálószer	Extrakciós hatékonyság
Diklórometán	100 %
RAMEB oldat	30%
CDPS oldat	14%
HPBCD oldat	4%

5. számú melléklet. A kémiai mobilizáció kockázata talajokban

5.1. táblázat. A talajbankban szereplő reprezentatív talajminták legfontosabb tulajdonságai

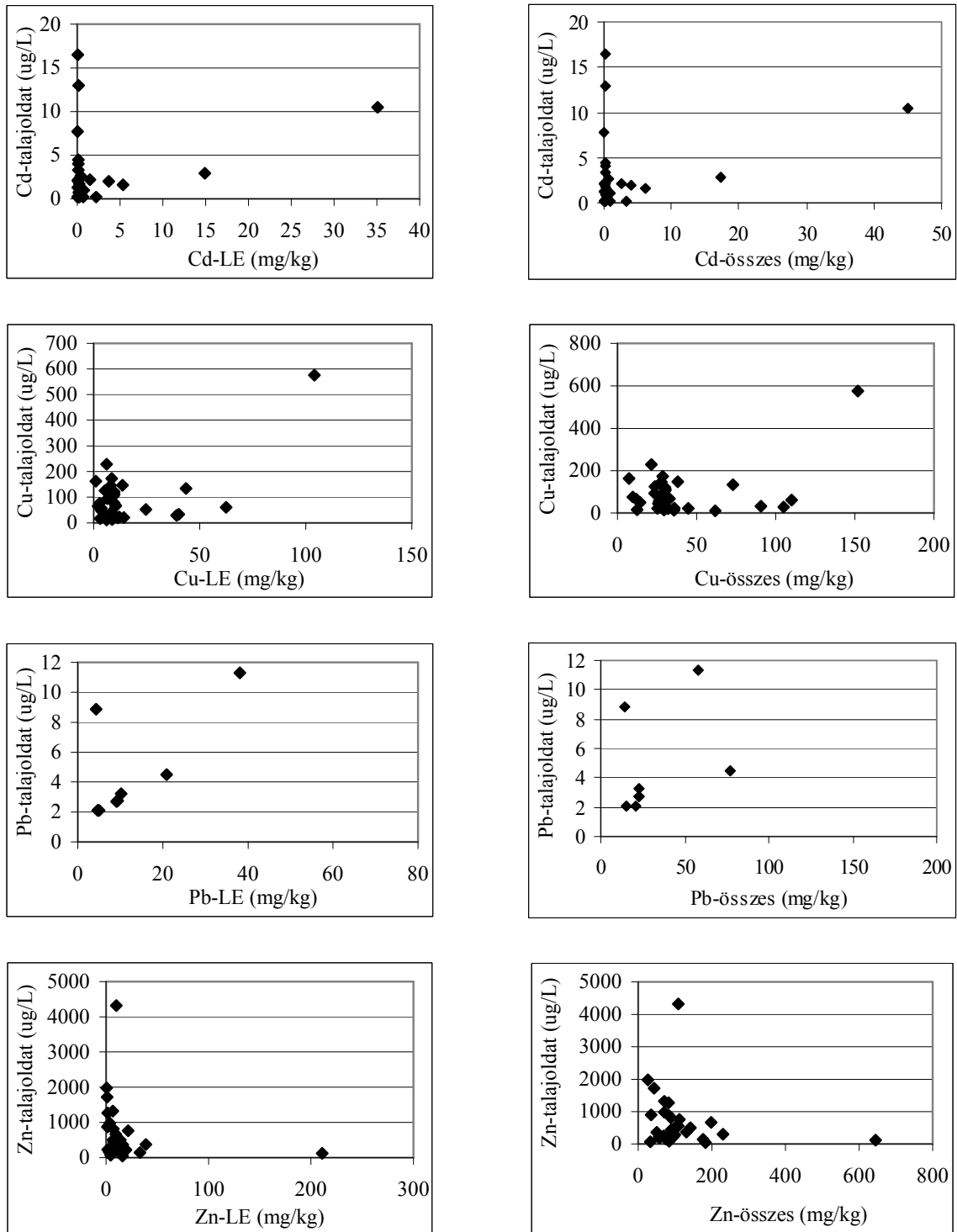
Talaj- minta száma	Talaj- minta jele	Talajtípus	Mintavételi hely	nedv.	pH	pH	pH	humusz	mechanikai összetétel			KA	só-
				tart.	H2O	KCl	CaCl2	tart.	homok	iszap	agyag		tart.
				%				%	%	%	%		%
1	E7405	humuszos öntéstalaj	Alsózsolca	45	6.44	5.49	5.93	7.44	13.11	40.91	45.99	66	0.02
2	E9105	Ramann-féle barna erdőtalaj	Répáshuta	34	6.13	5.14	5.42	6.44	16.67	47.98	35.36	50	<0.02
3	I1710	réti talaj	Gyöngyös	30	6.66	5.53	5.99	3.27	12.81	46.69	40.51	39	0.03
4	I1810	kovárányos barna erdőtalaj	Verpelét	12	7.28	6.60	6.66	1.32	75.53	15.68	8.79	23	<0.02
5	I5005	humuszos öntéstalaj	Györgytarló	32	7.30	6.12	6.66	2.54	7.43	66.99	25.59	44	<0.02
6	S3612	agyagbemosódásos barna erdőtalaj	Szécsény	23	7.60	6.91	7.09	2.07	25.77	45.90	28.33	38	0.03
7	S4810	nyers öntéstalaj	Gyöngyös	33	7.02	5.93	6.38	2.76	23.92	41.07	35.01	47	0.05
8	I0215	öntés réti talaj	Komoró	43	6.33	5.15	5.85	3.41	2.36	41.72	55.93	67	0.05
9	I0615	humuszos öntéstalaj	Tiszakerceseny	48	6.23	4.90	5.51	4.16	7.17	46.04	46.80	60	0.03
10	I1115	alföldi csernozjom talaj	Nagyhalász	16	6.08	5.13	5.26	2.54	57.30	27.61	15.09	29	<0.02
11	I1415	humuszos öntéstalaj	Csaholc	29	5.82	4.42	4.94	2.60	10.46	57.98	31.57	36	<0.02
12	I1715	nyers öntéstalaj	Vásárosnamény	23	7.65	6.99	7.06	2.16	62.45	27.67	9.89	32	<0.02
13	I2015	kovárányos futóhomok	Kisvarsány	14	7.96	7.42	7.49	0.84	56.76	31.80	11.45	23	<0.02
14	I2715	kovár. barna erdőt.	Pusztadobos	10	4.54	3.73	3.75	0.72	85.19	10.63	4.19	25	<0.02
15	Gyöngyös0	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	26	7.23	6.03	6.57	2.83	7.38	55.31	37.31	38	0.04
16	Cu 1	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	28	6.80	5.80	6.16	2.96	7.26	54.57	38.18	39	0.03
17	Cu 2	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	28	6.68	5.69	6.04	3.72	7.22	55.08	37.70	39	0.04
18	Cu 3	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	27	6.72	5.62	5.99	3.78	8.57	56.05	35.37	38	0.02
19	Cd 1	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	28	6.94	5.95	6.30	3.51	6.84	55.83	37.32	41	0.03
20	Cd 2	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	27	7.28	6.36	6.70	3.56	10.19	54.37	35.45	40	0.04
21	Cd 3	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	27	7.08	6.14	6.51	3.58	9.98	52.93	37.08	40	0.04
22	Pb 2	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	27	7.17	6.23	6.61	3.27	9.54	54.25	36.20	39	0.04
23	Pb 3	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	29	7.08	6.06	6.42	3.34	9.93	52.54	37.52	39	0.02
24	Zn 1	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	29	6.70	5.73	6.04	3.40	9.14	55.90	34.96	39	0.04
25	Zn 2	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	28	6.55	5.56	5.88	4.21	8.19	57.28	34.53	38	0.03
26	Zn 3	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	28	6.96	6.07	6.38	3.75	8.65	55.17	36.17	40	0.04
27	Pb 1	Ramann-féle barna erdőtalaj	Gyöngyös Tas-pusztá	28	7.54	6.73	7.02	3.42	10.09	54.69	35.23	40	0.03
28	B1732 II.1	réti csernozjom	Karcag	24	6.58	5.28	5.61	2.84	9.23	54.00	36.79	38	<0.02
29	B1732 II.20	réti csernozjom	Karcag	33	5.40	4.59	4.86	3.13	5.14	57.00	37.87	42	0.09
30	S4920	mohaláp talaj	Zalavár	121	7.01	6.52	6.81	28.20	53.21	33.52	13.28	75	0.04
31	I2802	réti talaj	Kölked	24	6.52	5.77	6.03	3.52	5.67	62.06	32.27	39	0.09
32	S5319	Ramann-féle barna erdőtalaj	Salföld	20	6.81	6.17	6.08	2.20	63.64	26.65	9.72	27	<0.02
33	E5107	kilúgzott csernozjom talaj	Szabadegyháza	20	6.28	5.46	5.59	3.37	63.80	21.59	14.62	27	<0.02
min.				10	4.54	3.73	3.75	0.72	2.36	10.63	4.19	23	0.02
max.				121	7.96	7.42	7.49	28.20	85.19	66.99	55.93	75	0.09

5.2. táblázat A talajbankhoz kiválasztott talajok és talajoldatok nehézfém-szennyezettsége

Talaj- minta száma	Talajok nehézfémtartalma								Talajoldat tulajdonságok											
	Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn	pH	EC	DOC	HCO3-	Ca	Mg	K	Na	mért	mért	mért	mért
	LE	LE	LE	LE	összes	összes	összes	összes									Cd	Cu	Pb	Zn
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg		mS/cm	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/m3	mg/m3	mg/m3	mg/m3
1	0.25	25	9	9	0.41	28	22	109	6.69	0.256	136	41	33	8	4	8	1.40	52	3	560
2	1.51	6	10	7	2.55	62	31	142	6.11	0.174	100	34	25	1	2	8	2.20	11	<2	501
3	0.15	39	13	10	0.26	105	25	109	6.05	0.277	67	36	28	4	12	8	13.00	29	<2	4320
4	0.07	62	4	4	0.09	110	12	33	7.02	0.205	92	41	25	3	11	5	<0.20	61	<2	71
5	0.62	12	16	16	0.98	36	57	183	7.58	0.379	101	129	56	11	5	10	<0.20	23	<2	45
6	0.06	4	6	12	0.09	14	61	70	7.37	0.512	144	78	61	10	32	11	1.30	49	<2	255
7	2.20	40	58	211	3.23	91	144	645	7.04	0.359	55	42	43	7	8	10	0.20	33	<2	122
8	0.74	14	21	11	1.06	45	77	230	7.28	0.236	127	64	30	7	5	10	1.00	21	5	303
9	0.42	9	13	9	0.78	36	57	198	7.17	0.205	91	55	23	6	3	11	2.60	13	<2	665
10	0.12	6	6	7	0.19	21	17	71	6.71	0.799	83	31	97	15	46	14	4.50	229	<2	1320
11	0.04	3	5	2	0.11	13	21	57	7.28	0.184	72	44	20	6	4	9	0.20	16	2	229
12	0.69	9	17	33	1.02	25	42	177	7.81	0.379	74	106	56	9	8	9	0.20	22	<2	143
13	0.06	2	3	1	0.13	12	13	43	7.56	0.379	44	75	56	4	3	4	16.50	65	<2	1720
14	0.02	1	2	1	0.02	7	17	26	5.35	0.225	35	10	14	2	18	4	7.70	163	<2	1980
15	0.11	7	7	3	0.22	24	86	76	7.25	0.451	73	34	60	9	5	10	0.30	94	<2	154
16	0.18	11	9	9	0.36	33	23	100	6.62	0.492	74	29	57	10	28	6	0.70	67	<2	284
17	0.17	14	9	7	0.32	38	23	91	6.63	0.563	50	23	70	12	24	6	0.30	147	<2	443
18	0.23	44	8	7	0.34	73	24	89	6.75	0.451	76	28	52	9	17	10	1.70	134	<2	812
19	5.35	10	8	11	6.22	30	23	96	6.82	0.441	102	36	47	10	25	8	1.60	112	<2	229
20	14.90	11	9	8	17.40	32	27	86	7.17	0.389	121	46	47	10	13	9	2.92	20	<2	279
21	35.10	10	8	6	45.10	30	22	85	7.07	0.441	56	34	57	12	18	7	10.50	121	<2	255
22	3.68	9	26	6	3.98	30	41	87	7.18	0.635	56	37	88	17	18	11	2.00	106	<2	284
23	0.25	10	38	19	0.35	29	58	88	7.09	0.338	69	34	40	10	23	6	0.20	77	11	225
24	0.22	8	9	14	0.33	28	23	99	6.51	0.512	44	28	55	11	46	6	0.80	146	3	501
25	0.39	9	12	21	0.57	29	24	112	6.35	0.451	41	24	50	10	36	8	0.70	173	<2	761
26	0.23	8	10	39	0.52	28	23	131	6.81	0.441	46	29	54	10	28	9	0.50	40	3	375
27	0.41	10	16	15	0.54	29	30	84	7.69	0.471	101	81	67	13	20	7	0.60	67	<2	84
28	0.12	4	5	2	0.23	26	23	83	6.90	0.133	30	18	59	13	2	6	4.01	45	<2	1270
29	0.12	4	5	1	0.21	26	23	84	5.87	1.885	39	21	302	44	26	6	3.30	57	<2	873
30	0.04	9	7	3	0.48	29	29	58	7.80	0.768	223	166	146	28	1	15	<0.20	14	<2	187
31	0.11	5	7	4	0.21	24	21	71	6.06	4.611	43	15	695	143	21	58	2.20	126	<2	979
32	0.08	104	4	16	0.14	152	14	51	7.06	0.184	109	43	20	6	30	4	0.24	576	9	363
33	0.05	3	5	2	0.11	10	15	36	5.97	0.348	96	19	47	11	5	6	2.07	76	2	901
min.	0.02	1	2	1	0.02	7	12	26	5.35	0.133	30	10	14	1	1	4	0.20	11	2	45
max.	35.10	104	58	211	45.10	152	144	645	7.81	4.611	223	166	695	143	46	58	16.50	576	11	4320

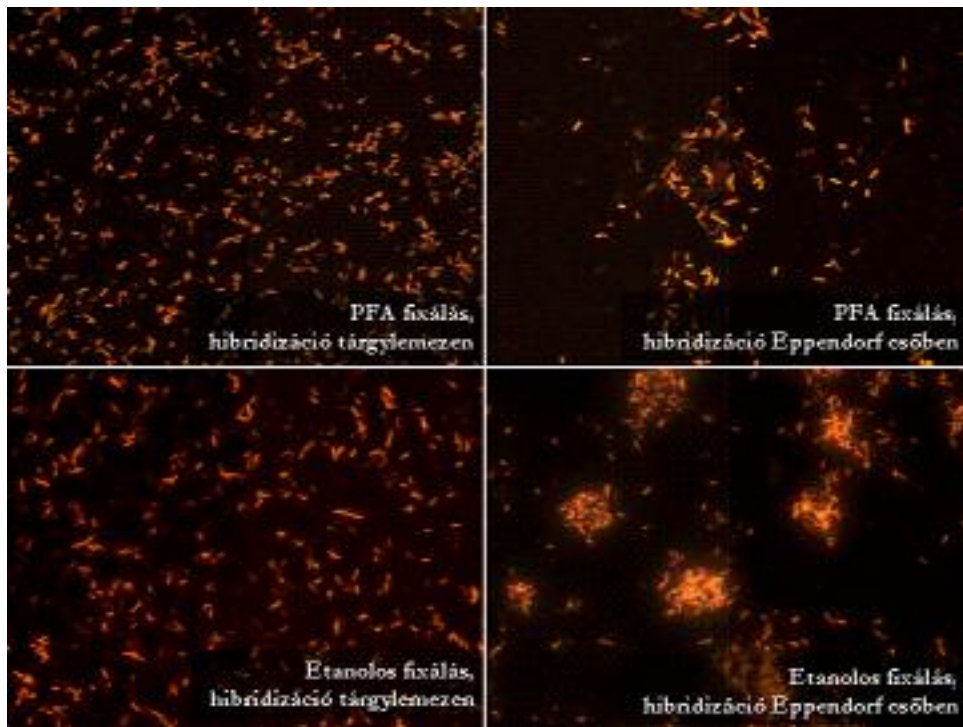
5.3. táblázat. A talajoldat szennyezettségének jellemzése

Talaj- minta száma	Szennyező koncentráció				Kockázati hányados				Megoszlási hányados				Megoszlási hányados			
	Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn	Lakanen-Erviö				összes			
	mg/m3	mg/m3	mg/m3	mg/m3					Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn
	A = 0.4	A = 10	A = 3	A = 65					L/kg	L/kg	L/kg	L/kg	L/kg	L/kg	L/kg	L/kg
1	1.0	42		495	4	5	1	9	176	474	3385	17	293	536	8296	195
2	1.8	1		436	6	1		8	686	541		13	1159	5469		283
3	12.6	19		4255	33	3		66	12	1344		2	20	3608		25
4		51		6		6		1		1016		60		1792		472
5		13				2		1		533		361		1586		4103
6	0.9	39		190	3	5		4	43	73		45	68	288		274
7		23		57	1	3		2	11000	1226		1730	16150	2771		5287
8	0.6	11	2	238	3	2	2	5	738	675	4644	38	1060	2108	17178	759
9	2.2	3		600	7	1		10	163	669		14	302	2712		298
10	4.1	219		1255	11	23		20	26	27		5	43	93		54
11		6		164	1	2	1	4	210	189	2229	7	550	796	10190	250
12		12		78	1	2		2	3445	417		231	5100	1161		1238
13	16.1	55		1655	41	7		26	4	31		1	8	182		25
14	7.3	153		1915	19	16		30	2	6		0	3	44		13
15		84		89	1	9		2	363	70		20	727	251		494
16	0.3	57		219	2	7		4	261	156		32	514	487		351
17		137		378	1	15		7	577	93		16	1070	259		205
18	1.3	124		747	4	13		12	137	325		9	201	544		109
19	1.2	102		164	4	11		4	3344	87		49	3888	271		418
20	2.5	10		214	7	2		4	5103	567		27	5959	1582		309
21	10.1	111		190	26	12		4	3343	80		25	4295	248		335
22	1.6	96		219	5	11		4	1840	89		21	1990	284		307
23		67	8	160	1	8	4	3	1240	125	3372	85	1755	374	5106	391
24	0.4	136		436	2	15	1	8	273	56	3395	27	414	189	8261	197
25	0.3	163		696	2	17		12	563	50		28	813	165		147
26	0.1	30		310	1	4	1	6	454	205	3168	103	1038	699	7205	349
27	0.2	57		19	2	7		1	682	152		184	902	435		1001
28	3.6	35		1205	10	4		20	31	88		1	57	577		65
29	2.9	47		808	8	6		13	35	63		1	62	462		96
30		4		122		1		3		600		18		2056		309
31	1.8	116		914	6	13		15	49	43		4	93	188		73
32		566	6	298	1	58	3	6	317	181	486	45	563	264	1567	139
33	1.7	66		836	5	8	1	14	25	36	2386	2	53	128	7333	40
min.	0.1	1	2	6	1	1	1	1	2	6	486	0	3	44	1567	13
max.	16.1	566	8	4255	41	58	4	66	11000	1344	4644	1730	16150	5469	17178	5287

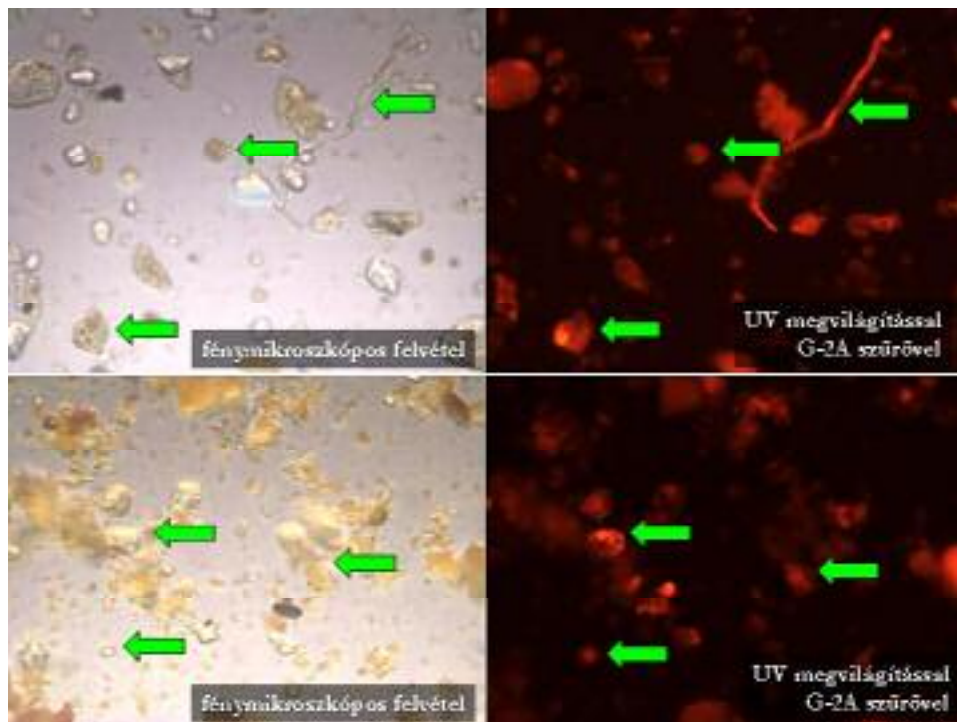


5.1. ábra. A talajoldat Cd, Cu, Pb, Zn tartalma a talaj nehézfém tartalmának függvényében. A reaktív, könnyen felvehető nehézfém tartalmat Lakanen–Erviö módszerrel, az összes nehézfém tartalmat feltárással határoztuk meg.

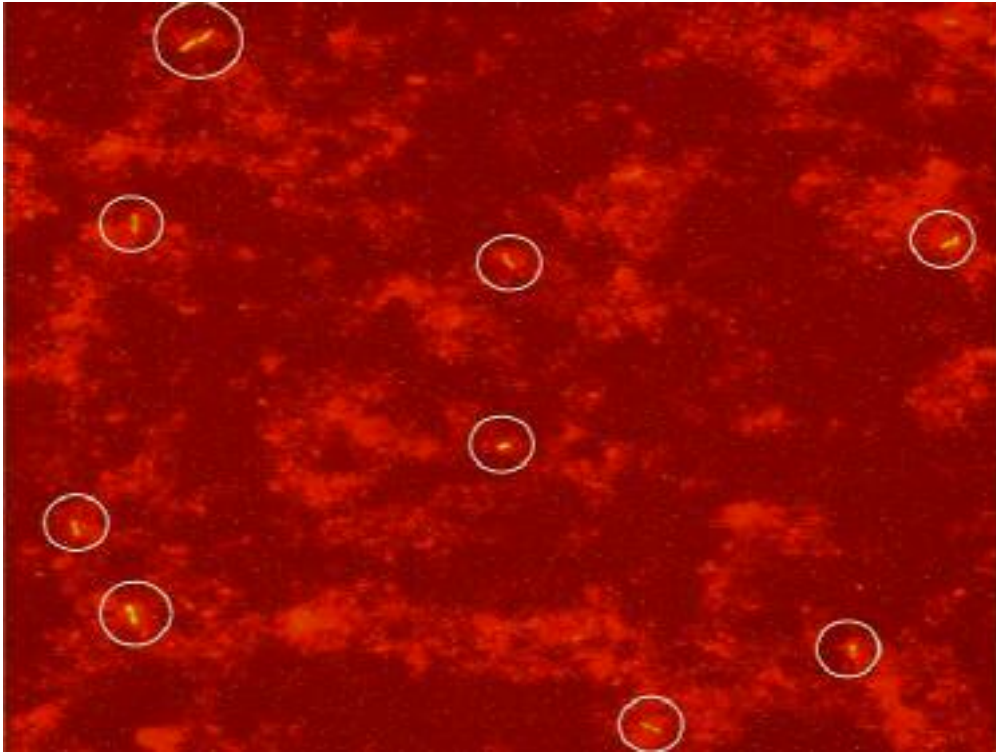
2. számú melléklet: Fluorescens *in situ* hibridizáció (FISH) talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározására



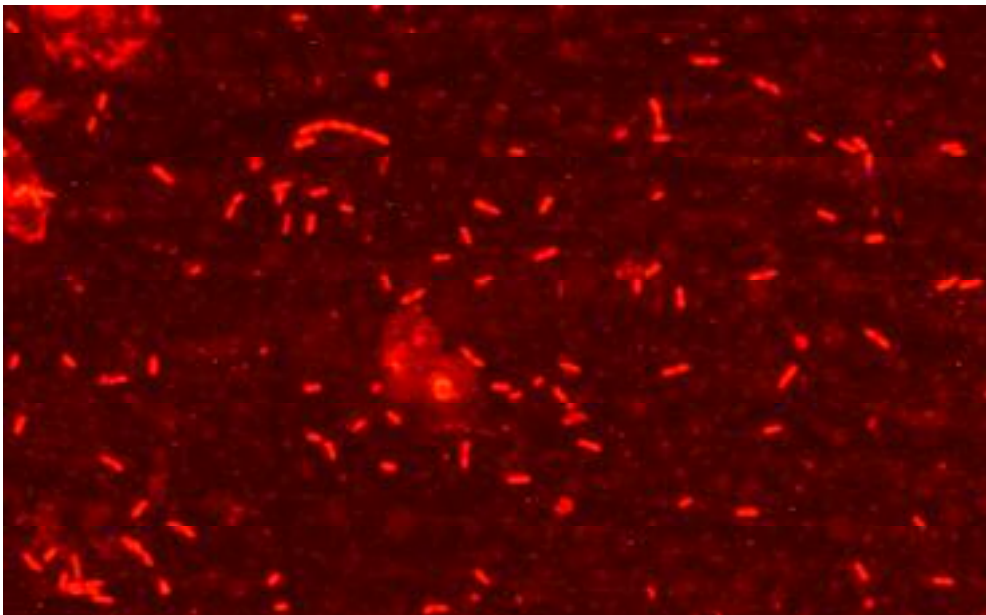
1. ábra: Baktériumszuszpenzió különböző mintaelőkészítéssel



2. ábra: Talaj vizes szuszpenziójának autofluoreszcenciája. Felvételek festés nélkül fénymikroszkóppal illetve speciális mikroszkópiával



3. ábra: Talajszuszpenzió fluoreszcens in situ hibridizáció után. A talajmátrixba kevert *Pseudomonas* baktériumok bekarikázva, felvétel UV mikroszkópiával: UV megvilágítás, G-2A szűrővel

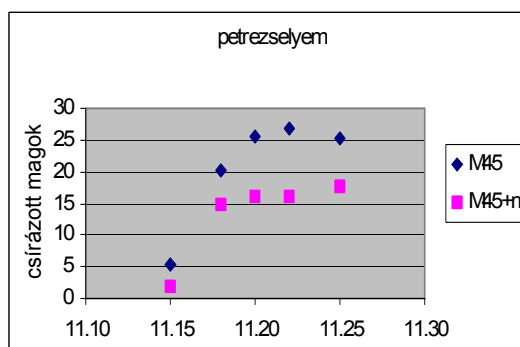
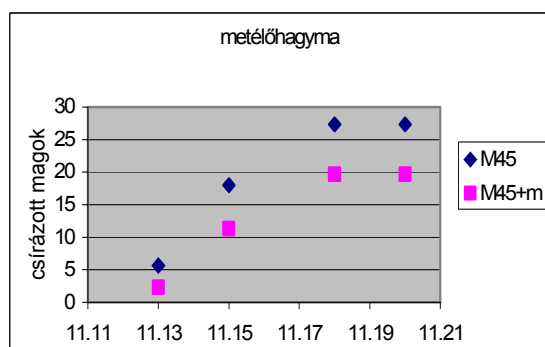
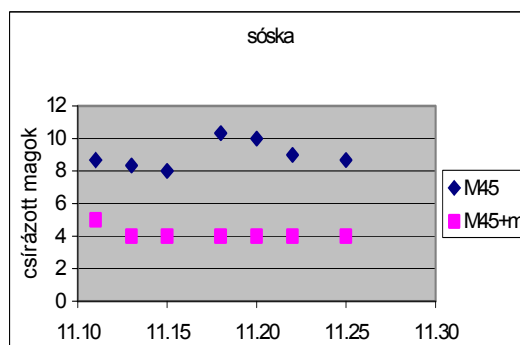
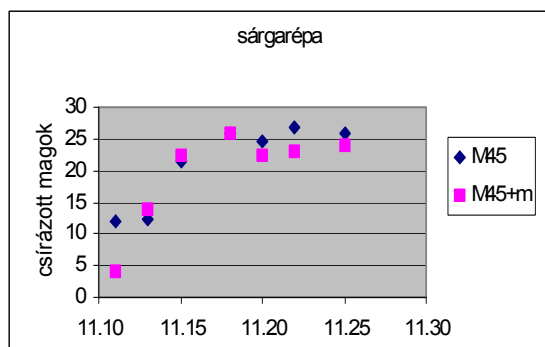


4. ábra: *Pseudomonas fluorescens* inokulummal beoltott 3,5 % formaldehiddel fixált kontroll talaj szuszpenziójáról készített kép EUB 338-as próbával történő hibridizációt követően

számú melléklet. Toxikus fémek növényakkumulációja: bioakkumulációs teszt megalapozása

7.1.táblázat:A bioakkumulációs kísérlet indításának körülményei

Talajok	
M45, M45+m, M45+5B	K14, S1, S2
Növények	
Sóska (<i>Rumex acetosa</i>) – Pallagi nagylevelű	Sóska (<i>Rumex acetosa</i>) – Pallagi nagylevelű
Petrezselyem (<i>Petroselinum crispum</i>) – Korai cukor	Petrezselyem (<i>Petroselinum crispum</i>) – Korai cukor
Sárgarépa (<i>Daucus carota</i>) – Nantesi	
Metélőhagyma (<i>Allium schoenoprasum</i>) – Kínai metélőh.	
Párhuzamos minták száma	
Három	kettő



7.1. ábra: A szennyezettség hatása a növények csírázására a bioakkumulációs kísérletben



1 hónapos növények a szennyezetlen M45 talajban



1 hónapos növények a meddővel szennyezett M45+m talajban

2.1. ábra. A bioakkumulációs kísérlet (sóska, sárgarépa, petrezselyem, metélőhagyma) 1 hónap elteltével

7.2.táblázat. A bioakkumulációs kísérletből kapott minták BCF_{összes} értékek

BCF _{összes}														
As	pH		Cd	pH		Cu	pH		Pb	pH		Zn	pH	
0,03	4,02	M45+m gy petr	21,92	4,02	M45+m hagyma	0,44	4,02	M45+m hagyma	0,16	4,70	M45 h s.répa	2,00	4,02	M45+m hagyma
0,03	4,02	M45+m hagyma	4,39	4,02	M45+m h s.répa	0,36	4,70	M45 gy petr	0,08	4,70	M45 sóska	1,05	4,02	M45+m sóska
0,02	4,70	M45 h petr	3,21	4,02	M45+m sóska	0,35	4,02	M45+m gy petr	0,07	4,70	M45 hagyma	0,80	4,70	M45 h s.répa
0,02	6,29	K14 h petr	1,30	5,28	S2 sóska	0,34	4,70	M45 hagyma	0,03	4,02	M45+m gy petr	0,76	4,02	M45+m h petr
0,02	5,28	S2 h petr	1,08	4,02	M45+m gy petr	0,29	4,02	M45+m sóska	0,02	4,02	M45+m h s.répa	0,74	5,28	S2 sóska
0,02	4,70	M45 h s.répa	0,83	4,70	M45 sóska	0,26	4,70	M45 h s.répa	0,02	4,02	M45+m gy s.répa	0,59	4,70	M45 hagyma
0,02	5,61	S1 h petr	0,77	4,02	M45+m gy s.répa	0,25	4,02	M45+m h s.répa	0,02	4,02	M45+m sóska	0,59	4,70	M45 sóska
0,01	5,28	S2 sóska	0,76	4,70	M45 hagyma	0,25	4,70	M45 h petr	0,01	4,02	M45+m h petr	0,46	4,02	M45+m h s.répa
0,01	4,02	M45+m h petr	0,54	4,02	M45+m h petr	0,22	4,70	M45 sóska	0,01	4,70	M45 gy s.répa	0,40	4,02	M45+m gy petr
0,01	4,02	M45+m sóska	0,52	4,70	M45 h s.répa	0,22	4,02	M45+m h petr	0,01	4,02	M45+m hagyma	0,35	4,70	M45 h petr
0,01	4,02	M45+m gy s.répa	0,28	4,70	M45 gy s.répa	0,21	4,02	M45+m gy s.répa	nsz	6,29	K14 sóska	0,29	4,70	M45 gy petr
0,01	4,70	M45 sóska	0,22	5,61	S1 sóska	0,16	4,70	M45 gy s.répa	nsz	5,61	S1 sóska	0,27	5,61	S1 sóska
nsz	6,29	K14 sóska	0,18	6,29	K14 sóska	0,13	5,28	S2 sóska	nsz	5,28	S2 sóska	0,22	4,02	M45+m gy s.répa
nsz	4,02	M45+m h s.répa	0,11	5,28	S2 h petr	0,08	6,29	K14 sóska	nsz	5,28	S2 h petr	0,22	6,29	K14 sóska
nsz	4,70	M45 hagyma	0,08	4,70	M45 gy petr	0,07	5,61	S1 sóska	nsz	6,29	K14 h petr	0,21	5,28	S2 h petr
nsz	5,61	S1 sóska	0,05	5,61	S1 h petr	0,07	5,28	S2 h petr	nsz	4,70	M45 gy petr	0,17	4,70	M45 gy s.répa
nsz	4,70	M45 gy petr	0,02	6,29	K14 h petr	0,06	6,29	K14 h petr	nsz	4,70	M45 h petr	0,09	5,61	S1 h petr
nsz	4,70	M45 gy s.répa	nsz	4,70	M45 h petr	0,06	5,61	S1 h petr	nsz	5,61	S1 h petr	0,07	6,29	K14 h petr

7.3.táblázat. A bioakkumulációs kísérletből kapott minták BCF_{mobilis} értékek

BCF _{mobilis}											
Cd	pH		Cu	pH		Pb	pH		Zn	pH	
40,70	4,02	M45+m hagyma	1,65	4,02	M45+m hagyma	0,60	4,70	M45 h s.répa	13,11	4,70	M45 h s.répa
8,15	4,02	M45+m h s.répa	1,31	4,02	M45+m gy petr	0,28	4,70	M45 sóska	12,41	4,02	M45+m hagyma
5,96	4,02	M45+m sóska	1,15	4,70	M45 gy petr	0,28	4,70	M45 hagyma	9,78	4,70	M45 hagyma
2,28	4,70	M45 sóska	1,11	4,02	M45+m sóska	0,25	4,02	M45+m gy petr	9,71	4,70	M45 sóska
2,08	4,70	M45 hagyma	1,09	4,70	M45 hagyma	0,19	4,02	M45+m h s.répa	6,51	4,02	M45+m sóska
2,03	5,28	S2 sóska	0,95	4,02	M45+m h s.répa	0,15	4,02	M45+m gy s.répa	5,77	4,70	M45 h petr
2,01	4,02	M45+m gy petr	0,85	4,70	M45 h s.répa	0,14	4,02	M45+m sóska	4,78	4,70	M45 gy petr
1,43	4,02	M45+m gy s.répa	0,82	4,02	M45+m h petr	0,12	4,02	M45+m h petr	4,74	4,02	M45+m h petr
1,42	4,70	M45 h s.répa	0,81	4,70	M45 h petr	0,06	4,02	M45+m hagyma	2,86	4,02	M45+m h s.répa
1,00	4,02	M45+m h petr	0,80	4,02	M45+m gy s.répa	0,04	4,70	M45 gy s.répa	2,81	4,70	M45 gy s.répa
0,78	4,70	M45 gy s.répa	0,72	4,70	M45 sóska	0,01	6,29	K14 sóska	2,49	4,02	M45+m gy petr
0,44	5,61	S1 sóska	0,52	4,70	M45 gy s.répa	0,01	5,61	S1 sóska	1,65	5,28	S2 sóska
0,27	6,29	K14 sóska	0,29	5,28	S2 sóska	0,01	5,28	S2 sóska	1,39	4,02	M45+m gy s.répa
0,23	4,70	M45 gy petr	0,17	6,29	K14 sóska	nsz	5,28	S2 h petr	0,72	5,61	S1 sóska
0,18	5,28	S2 h petr	0,16	5,61	S1 sóska	nsz	6,29	K14 h petr	0,50	6,29	K14 sóska
0,08	5,61	S1 h petr	0,16	5,28	S2 h petr	nsz	4,70	M45 gy petr	0,48	5,28	S2 h petr
0,04	6,29	K14 h petr	0,13	6,29	K14 h petr	nsz	4,70	M45 h petr	0,23	5,61	S1 h petr
nsz	4,70	M45 h petr	0,12	5,61	S1 h petr	nsz	5,61	S1 h petr	0,16	6,29	K14 h petr

7.4. táblázat. A bioakkumulációs kísérletből kapott kiemelkedő BCF_{mobilis} értékek

Cd		Cu		Pb		Zn	
40,7	M45+m metélőhagyma	1,65	M45+m metélőhagyma	0,60	M45 s.répa hajtás	13,1	M45 s.répa hajtás
8,15	M45+m s.répa hajtás	1,31	M45+m petr. gyökér	0,28	M45 sóska	12,4	M45+m metélőhagyma
5,96	M45+m sóska	1,15	M45 petr. gyökér	0,28	M45 metélőhagyma	9,78	M45 metélőhagyma
		1,11	M45+m sóska	0,25	M45+m petr. gyökér	9,71	M45 sóska
		1,09	M45 metélőhagyma				

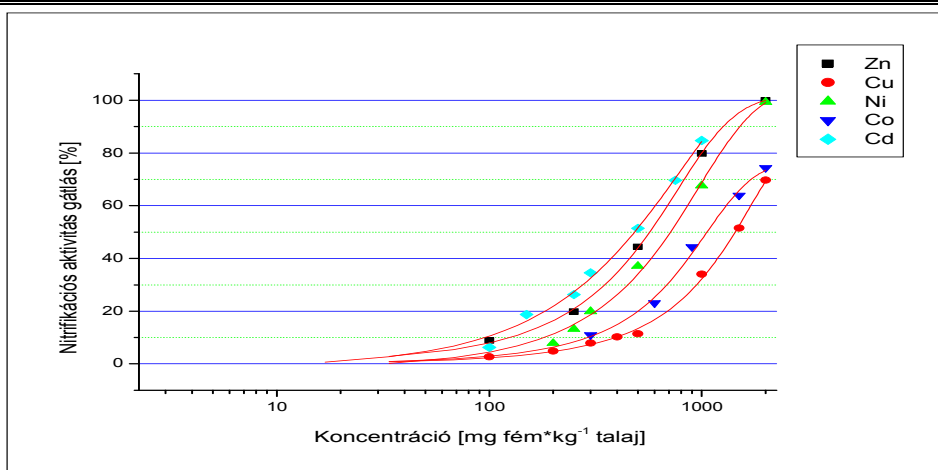
3. számú melléklet: Nitrifikációs gyorseszteszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére

8.1. táblázat. Három teszt összehasonlítása 8 talajminta nitrifikáló aktivitásának mérésére

Talajminta	Berg és Rosswall 5h	Berg és Rosswall 24h	Winther és Nielsen 6h
	[$\mu\text{g NO}_2^- \text{-N} * \text{g}^{-1} \text{ talaj} * \text{h}^{-1}$]		
1	0,173	0,074	0,119
2	0,135	0,070	0,140
3	0,118	0,034	0,119
4	0,291	0,157	0,291
5	0,166	0,078	0,157
6	0,215	0,127	0,200
7	0,510	0,052	0,751
8	0,431	0,048	0,728

8.2. táblázat. A nitrifikáló aktivitás gátlás [%] a fémek koncentrációjának függvényében

[$\text{mg} * \text{kg}^{-1}$ talaj]	Zn	Cu	Ni	Co	Ba	Pb	Mo	Cd
0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	8,9	2,7	-	-	-	0	-	6,3
150	-	-	-	-	-	-	-	18,7
200	-	4,8	7,8	-	-	0	6,4	-
250	19,8	-	13,2	-	-	-	-	26,3
300	-	7,9	19,9	11	-	-	-	34,5
400	-	10,3	-	-	-	-	-	-
500	44,4	11,4	37	-	-	0	-	51,4
600	-	-	-	23,1	-	0	-	-
700	-	-	-	-	6,1	-	-	-
750	-	-	-	-	-	-	-	69,6
900	-	-	-	44,4	-	-	-	-
1000	79,8	34,0	67,6	-	-	-	6,3	84,7
1500	-	51,5	-	63,9	16,4	-	-	-
2000	-	69,7	99,3	74,4	18,7	-	-	-



8.1. ábra A fémekkel mesterségesen szennyezett kerti talaj koncentráció-válasz görbéje

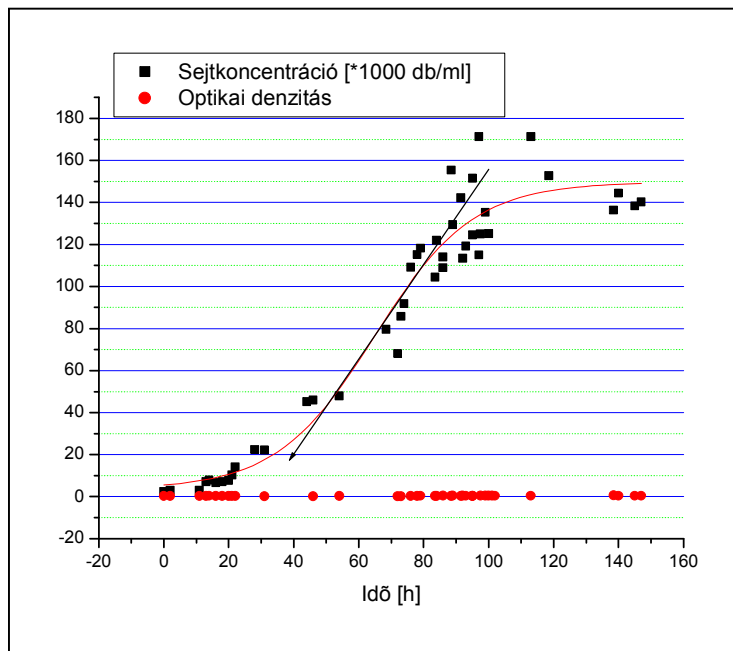
8.3. táblázat: A fémekkel szennyezett talajok EC₂₀ és EC₅₀ értékei nitrifikációs gyorseszteszt alapján

Szennyezőanyag	B: szennyezettségi határérték	EC ₂₀ [mg*kg ⁻¹ talaj]	EC ₅₀ [mg*kg ⁻¹ talaj]
Cd	1	185	481
Zn	250	241	565
Ni	40	322	708
Co	30	505	1059
Cu	100	698	1442
Ba	250	>1000	>1000
Pb	100	>1000	>1000
Mo	10	>1000	>1000

8.4. táblázat: A nitrifikáló aktivitás gátlás [%] a szerves szennyezőanyag koncentrációjának függvényében

Idő [nap]	3 000 [mg*kg ⁻¹ talaj]	6 000 [mg*kg ⁻¹ talaj]	10 000 [mg*kg ⁻¹ talaj]	30 000 [mg*kg ⁻¹ talaj]
	Dizel olaj			
2	12,3	22,4	21,1	23,8
7	24,0	30,9	36,0	46,9
17	-	-	68,4	59,8
24	-	-	44,9	57,7
	Transzformátorolaj (TO 40A)			
2	5,4	6,7	5,3	7,0
7	11,5	11,3	21,9	20,6
17	35,6	38,2	49,0	38,4
	Háztartási tüzelő olaj			
2	17,5	22,3	18,6	22,0
7	20,3	29,4	39,0	44,2
17	-	-	70,4	68,9
24	-	-	63,9	57,6

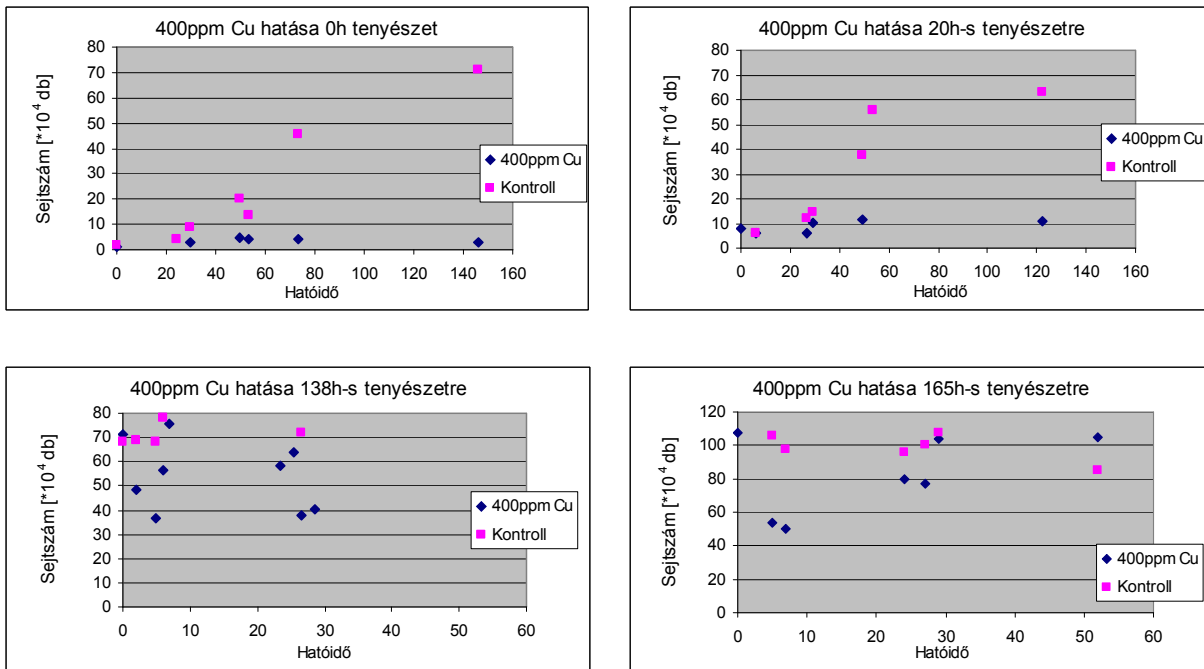
4. számú melléklet *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlási teszt szennyezett talajok környezettoxikológiai tesztelésére



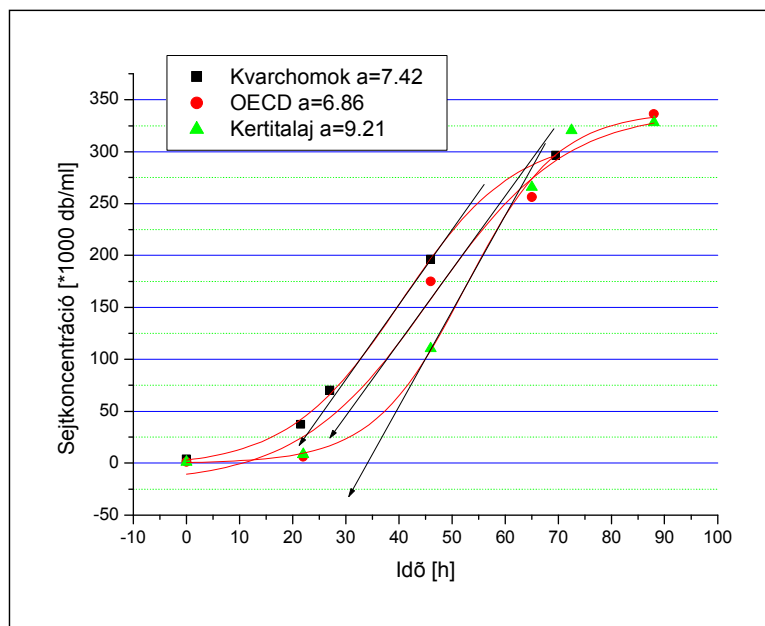
9.1. ábra *Tetrahymena pyriformis* sejtkoncentráció és az optikai denzitás változása az időben

9.1. táblázat Mikroszkóppal és részecskeszámlálóval meghatározott egysejtű koncentrációk

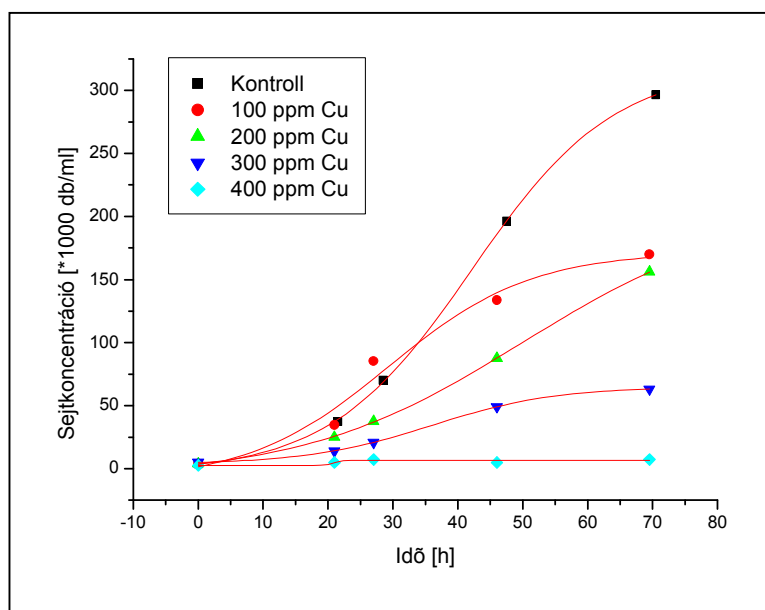
Tenyésztési idő [h]	A minta		B minta	
	Mikroszkópos sejtszám [1000 db*m ⁻¹]	Műszeres sejtszámlálóval [1000 db*m ⁻¹]	Mikroszkópos sejtszám [1000 db*m ⁻¹]	Műszeres sejtszámlálóval [1000 db*m ⁻¹]
0	2,8	2,3	2,8	2,3
27,5	20,1	12,3	25,3	13,7
48	226,1	60,7	137,5	45
53	240,9	6,7	239,3	11,3
73,5	558,3	4,5	402,1	12



9.2. ábra Réz-oldat hatása a különböző korú *Tetrahymena pyriformis* tenyészetekre



9.3. ábra *Tetrahymena pyriformis* szaporodása szennyezetlen, kontroll talajokon



9.4. ábra: Az aktuális sejtkoncentráció a rézzel szennyezett talajokat tartalmazó tesztsövekben *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlási teszt esetén

9.2. táblázat: *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlása szennyezőanyagok hatására

6. Szennyezőanyag	Koncentráció a talajban [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	Koncentráció a tápoldatban [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	Szaporodás gátlás [%]
Cu	2 170	100	50
	4 340	200	58
	6 510	300	79
	8 680	400	100
Cd	2	0,1	0
	40	1,8	0
	300	13,8	13
	500	23,0	100
	1 000	46,0	100
Pb	50	2,3	0
	100	4,6	20
Zn	250	11,5	0
	500	23,3	11
	750	34,6	34

5. számú melléklet: Az első munkaszakaszban készített kutatási jelentések listája

- BME: Szennyezett talaj jellemzésére szolgáló módszeregyüttes – TalajTesztelőTriád
- CYL: Az anyagok hidrofób jellegét jellemző oktanol-víz megoszlási hányados (Kow) meghatározásának kísérleti és *in silico* módszerei
- BME: Az oktanol-víz megoszlási hányados (Kow) elméleti és kísérleti összefüggései, meghatározásának módszerei
- TAKI: Szervetlen szennyezőanyagok talajból és talajvízből történő meghatározásának módszerei az EU-ban
- CYL: Szerves szennyezőanyagok és komponensek műszeres kémiai analízise (gázkromatográfia)
- CYL: Oktanol-víz megoszlási hányados (Kow) meghatározásának kidolgozása
- CYL: Ciklodextrinek szennyezőanyagok megoszlására gyakorolt hatásának vizsgálata
- CYL: Talaj-víz megoszlási hányadosok (Kd) meghatározása különböző típusú talajokra egyes szerves szennyezőanyag komponensekre és tipikus talajszennyező szénhidrogén-keverékekre, a különféle ciklodextrinek hatása a megoszlásra
- CYL: A ciklodextrinnel extrahálható szennyezőanyag mennyisége és a biodegradálhatóság közötti összefüggés vizsgálata
- TAKI: Szennyezett talajbank összeállítása
- TAKI: Összes és mobilizálható nehézfém-tartalom meghatározása különböző kémiai módszerekkel. A kémiai mobilizáció kockázata talajokban.
- BME: ATP mennyiség meghatározása talajban lumineszcencián alapuló eljárással
- BME: Fluorescens *in situ* hibridizáció (FISH) talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározására
- BME: Növényakkumulációs teszt megalapozása toxikus fémekre (BCF meghatározása)
- BME: Mikrokozmosz teszt toxikus fémekkel szennyezett talajok stabilizációjára
- BME Növényi bioakkumulációs gyorseszteszt kifejlesztése
- BME: Nitrifikációs gyorseszteszt szennyezett talajok környezetttoxikológiai tesztelésére
- BME: *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlási teszt szennyezett talajok környezetttoxikológiai tesztelésére
- BME: Nematoda (*Panagrellus redivivus*) mortalitási teszt szennyezett talajok környezetttoxikológiai tesztelésére
- BME: Szennyezőanyagok mutagén hatásának vizsgálatára szolgáló géntoxikológiai módszerek
- BME: Ames-teszt szennyezett talajok mutagén hatásának jellemzésére
- BME: Laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek tervezése a kidolgozott módszerek alkalmazására