



Környezettoxikológiai vizsgálatok *Aliivibrio fischeri* tesztorganizmussal

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport

1. Bevezetés

Az környezettoxikológia (ökotoxikológia), amely szennyezőanyagoknak egyedekre, populációkra és az ökoszisztémára gyakorolt hatását vizsgálja, a környezeti hatásvizsgálat és az ökológiai kockázatbecslés fontos eszköze. Szerepe egyre jelentősebb a szennyezett területek ártalmatlanításának nyomon követésében illetve a már helyreállított területek megfigyelésében.

A hagyományos környezetvizsgálat során valamely mintát a kémiai összetétele alapján minősítenek szennyezettnek; figyelmen kívül hagyva a vizsgált szennyezőanyag biológiai hozzáférhetőségét, amely a kémiai forma mellett a mátrixhoz (talaj, üledék, lebegőanyag) való kötődés, és az egymás mellett előforduló szennyezőanyagok között fellépő, így antagonistá, additív vagy szinergikus kölcsönhatások függvénye. Az környezettoxikológiai tesztek a szennyezőanyagok biológiai hozzáférhetőségétől függően ítélik meg a vizsgált minta szennyezetttségét, vagyis az aktuális toxicitást mérik, így a kémiai analitikai módszerek fontos kiegészítői. (Gruiz és munkatársai 1995/a, 1995/b; Gruiz és munkatársai, 2001)

Az ökotoxikológia fogalmának definiálása nem könnyű feladat. Általános értelemben az ökotoxikológia a már ismert és az új szennyezőanyagokat, és azok környezetre gyakorolt ökológiai hatását tanulmányozza (Callow, 1993). Az ökotoxikológia számos tudomány (fizika, kémia, mikrobiológia, botanika, zoológia, ökológia, toxikológia, statisztika) elveit és eredményeit felhasználja (Vargha, 1991).

Az ökotoxikológiai tesztek figyelembe veszik az ökológia törvényszerűségeit, így egyed szinten az egyed élettani viselkedését (pusztulás, növekedés, energiaháztartás, biokémiai folyamatok, mutáció) vizsgálják, a populáció szintjén pedig a szaporodás, egyedsűrűség, eloszlás törvényszerűségeivel foglalkoznak. Társulás szintjén a fajszám, a fajok közötti kapcsolatok, indikátor fajok jelenléte; míg az ökoszisztéma szintjén a rendszer egészének anyag és energia forgalma áll az ökotoxikológia érdeklődésének középpontjában (Suter, 1989).

A leírtak egyenes következménye, hogy az ökotoxikológia eszköztára széles és a vizsgálatok tárgyától függően rendkívül változatos.

A szennyezőanyagok ökotoxikus hatását vizsgálhatjuk **egy fajt alkalmazó laboratóriumi tesztekkel**, amelyeknek számos előnye mellett néhány hátránya is megemlíthető. Az egy fajt alkalmazó tesztek többsége laboratóriumi körülmények között könnyen elvégezhető; műszert nem igényel, így kivitelezési költségük alacsony. Hátrányuk, hogy viszonylag alacsony a környezeti realizmusuk, mivel természetes viszonyok között nem pusztán egy faj egyedei kerülnek kapcsolatba a szennyezőanyaggal, hanem különböző fajok populációi. Így a szennyezőanyagok természetes viszonyok között fellépő hatásának megállapítására, az egy fajt alkalmazó tesztek félrevezető választ adhatnak (Van Capelleveen, 1995). Lényegében tehát az extrapolálás egy fajról, - a tesztorganizmusról - egy másik fajra vagy az ökoszisztéma egészére csak körültekintéssel végezhető el (Cairns és Pratt, 1989). Az egy fajt alkalmazó tesztek közül a mikrobiális módszerek tűnnek a legalkalmasabbaknak az ökoszisztéma jellemzésére, mivel majdnem minden ökoszisztémában megtalálhatók, így a jól választott tesztorganizmus reprezentálhatja a környezeti viszonyokat (Callow, 1993).

Az egy fajt alkalmazó tesztek között nagy számban található rövid ideig tartó eljárások, így az általuk nyert válasz a szennyezőanyag akut toxikus hatására utal és kevésbé képesek a hosszú távú (krónikus) hatások jelzésére.

Az egy fajt alkalmazó biotesztek végpontja széles skálán mozoghat. A leggyakrabban használt végpont a tesztorganizmus *túlélése*. Ökológiai szempontból azonban a szubletális reakciók tanulmányozása (*növekedésgátlás, szaporodás*) kedvezőbb, mint a túlélése. Mayer és munkatársai (1986) szerint viszont a szubletális végpontok jól 0,95-0,97 korrelálnak a túléléssel, így a túlélés is alkalmazható végpontjelzésként.

Sok esetben a tesztorganizmus *biokémiai, fiziológiai változása* használható a szennyezőanyag kimutatására. Végpontként igen gyakran alkalmazzák különböző *enzimek* (ATPáz, dehidrogenáz, foszfatáz, észteráz, luciferáz) *aktivitásának változását*. Torslov (1993) *Pseudomonas fluorescens* esetén összehasonlította különböző szennyezőanyagok növekedésre, dehidrogenáz és foszfatáz enzimaktivitásra gyakorolt hatását. A végpontok nem bizonyultak az összes szennyezőanyagra azonos érzékenységgűnek, amiből arra következtettek a szerzők, hogy különböző szennyezések esetén nem csupán a tesztorganizmust, de a tesztelési végpontot is körültekintően, optimálás útján kell megválasztani.

Sokszor különböző anyagszere-termék illetve valamely enzim szubsztrátjának koncentrációját használják a toxicitás vizsgálatára. A legismertebb rendszer (ATP-TOX) az ATP-szintet méri szentjánosbogár luciferáz enzimje, és D-luciferin kofaktor jelenlétében, luminométerrel (Xu és Dutka, 1987).

A biokémiai vizsgálatok közé tartoznak a respirációs és a mikrok calorimetriás tesztek. A respirációs tesztek a tesztorganizmus légzését tanulmányozzák (pl. BOI₅ teszt). A mikrok calorimetria a szennyezőanyag hatására bekövetkező hőmérséklet-fluxus változását méri (Callow, 1993).

A *Spirillum volutans* bakteriális mozgásképeségi tesztet Dutka írta le először (Callow, 1993). A módszer elve, hogy szennyezőanyag hatására a tesztorganizmus mozgásképesége csökken vagy megszűnik, mivel a kemotaxis mechanizmusáért felelős CheA, CheB, CheY, CheZ, CheR enzimek valamelyike gátolt.

A géntoxikológiai tesztek (Ames-teszt, SOS chromotest, Mutatox-teszt) a szennyezőanyagok mutagén hatását vizsgálják. Ebben az esetben a bioteszt végpontja a *mutáció*. Az Ames vagy *Salmonella* tesztet kifejllesztőjéről Amesről nevezték el. A módszer hisztidin auxotróf *Salmonella typhimurium* törzset használ, amely mutagén hatásra elveszti auxotróf jellegét, vagyis hisztidint nem tartalmazó táptalajon is képes növekedni. Az SOS chromotest alapja, hogy mutáció hatására az SOS repair mechanizmus aktiválódik. Mivel a tesztorganizmusban az SOS operon egy β -galaktozidáz operonnal összeépítve található, az SOS repair folyamataiért felelős enzimek szintézise együtt jár a β -galaktozidáz transzlációjával. A β -galaktozidázhoz megfelelő szubsztrátot adva színes terméket kapnak, amely kolorimetriásan meghatározható (Xu és munkatársai, 1987). A Mutatox-teszt *Aliivibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) sötét mutánsát használja, amely mutagén hatásra visszanyeri lumineszkáló képességét. A lumineszcencia luminométerrel detektálható (Kwan és Dutka, 1990). A fent említett tesztekhez emlős máj lecentrifugált frakcióját (9000 g), az S9-et adagolva modellezni lehet az emlősökben, illetve a halakban lezajló enzimatis reakciókat, így a bakteriális géntoxikológiai tesztekkel következtethetünk a szennyezőanyagok magasabb rendű szervezetekre gyakorolt hatására.

Géntoxikológiai tesztek (Mutatox, Ames, SOS Chromotest) összehasonlító vizsgálatát végezték el Legault és munkatársai (1994) és az Ames-tesztet találták a legérzékenyebbnek az általuk vizsgált mutagén anyagokra.

Az egy fajt alkalmazó tesztek hátrányait igyekeznek kiküszöbölni a **több fajt alkalmazó laboratóriumi tesztek**. Általában egymással kölcsönhatásban lévő és/vagy különböző trófikus szinteken lévő fajokat választanak tesztorganizmusként. A több fajt alkalmazó tesztek az 1. táblázatban találhatóak.

1. táblázat. Több fajt alkalmazó tesztek (Callow, 1993)

A bioteszt leírása	Vizsgált tulajdonság
Két baktérium törzs kompetíciós tesztje. 5 napos teszt	<i>a kompetíció eredménye</i>
Mikrobiális préda-predátor teszt. Időtartam: 3-5 hét.	<i>Préda, predátor egyedszáma</i>
Mikrokozmosz tesztek. Időtartam: 3-10 hét	<i>Egyedszám, fajösszetétel, légzés, heterotrof aktivitás,</i>
Mezokozmosz tesztek. Időtartam: 5-6 hónap	<i>Egyedszám, fajösszetétel, anyagcsere körforgalmak,</i>

Az 1. táblázatban felsoroltak közül különösen jelentősek az ún. *mikrokozmosz tesztek*. A mikrokozmosz a természetes környezet mesterségesen korlátozott részhalmaza, a természetes ökoszisztéma biológiai modellje (Vargha, 1991). Ezen tesztek egyed feletti szinten mérik a komplex hatásokat, nagyszámú, egymással kölcsönhatásban álló fajok populációit vizsgálják egyidejűleg, laboratóriumi körülmények között. A mikrokozmosz tesztek sem képesek a természetben lejároló folyamatokat tökéletesen modellezni, de az általuk szolgáltatott eredmény nagyobb biztonsággal vonatkoztatható a környezetre. Az 1. táblázatba sorolt mezokozmosz tesztek átmenetet képeznek a laboratóriumi mikrokozmosz és a szabadföldi vizsgálatok között. A mezokozmoszok szabadföldön létrehozott mesterséges rendszerek (pl. mesterséges tó), amelyet a vizsgált kemikáliával szennyeznek, majd nyomon követik az ökológiai változásokat.

A környezetünket érő szennyezések hatását leginkább a **szabadföldi vizsgálatokkal** jellemezhetjük. Ebben az esetben azonban ismernünk kell a terület ökológiáját, és a folyamatban lévő természetes változásokat. A vizsgálati eredményt ugyanis sokszor meghamisíthatják a szennyezőtől függetlenül bekövetkező, előre nem látható környezeti hatások, mint például, vírushatás vagy klímaváltozás.

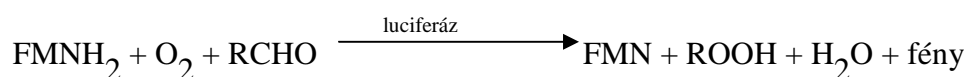
A *bioindikációs kísérletek* a területre jellemző indikátor fajok legkülönbözőbb jellemzőit (kihalás, betelepítés, invázió, fiziológiai változások) vizsgálják (Spellerberg, 1991).

A szabadföldi vizsgálatok közé tartoznak a *bioakkumulációs tesztek* is, amelyek a tesztorganizmus azon tulajdonságát használják ki, hogy azok képesek felvenni és raktározni a toxikus anyagokat. A bioakkumulációs tesztek két fajtáját különböztethetjük meg: az aktív módszerek a területen élő fajokat, míg a passzív tesztek a betelepített fajokat vizsgálják. A felhasznált tesztorganizmust a behatási idő eltelté után kémiai analízisnek vetik alá, és az akkumulált szennyezőanyag mennyiségéből következtetnek a terület szennyezettségére. Petró és munkatársa (1993) a Tokapatak fémszennyezettségét tanulmányozta kagyló (*Anodonta woodiana*) akkumulációs tesztel. Ugyancsak édesvízi kagylót (*Deissena polymorpha*) használtak Camusso és munkatársai (1994) a Pó-folyó vizsgálatára. Berger és Dallinger (1993) a szárazföldi csigákhoz tartozó *Arianta arbustorum* által akkumulált fém mennyiségét határozta meg fémekkel szennyezett területeken.

A szabadföldi vizsgálatok azonban költségesek, hosszú ideig tartanak, nagy szaktudást (botanika, zoológia, ökológia) és tapasztalatot igényelnek, így kevésbé alkalmasak standard módszerekként való alkalmazásra.

2. A bakteriális biolumineszcencia használata az ökotoxikológiában.

A biolumineszcencia, amely élő rendszer általi lumineszcens fénykibocsátást jelent számos ökotoxikológiai teszt alapját képezi. Sokféle organizmus (gerincesek, gerinctelenek, baktériumok) képes lumineszcens fényt kibocsátani. A bakteriális lumineszcens fény képzésének alapegyenlete a következő (Steinberg és munkatársai, 1995).



ahol, FMNH_2 a redukált míg a FMN az oxidált flavin mononukleotid.

A természetben fellelhető lumineszcens baktériumok a *Photobacterium* nemzetség tagjai. A leggyakrabban használt tesztorganizmus a *Aliivibrio fischeri* (korábbi nevén *Vibrio fischeri*), amit sok publikációban azonosítanak a *Photobacterium phosphoreum* nevű baktériummal.

Mivel a bakteriális lumineszcenciában szerepet játszó enzimek ismertek és az őket kódoló géneket is feltérképezték (Meighen, 1988); ezért genetikailag manipulált, lumineszcenciáért felelős gének beültetésével nyert baktériumok hozhatók létre (Steinberg és munkatársai, 1995). Lee és munkatársai (1991) a szentjánosbogár luciferáz génjét ültették *E. coliba*. Lapinen és munkatársai (1990) *Vibrio harvey* luciferáz génjét vitték át *E. coliba*. Van Dyke és munkatársai (1994) azt a tulajdonságot kihasználva, hogy a hősokk fehérjék átírása szennyezőanyag jelenlétében indukálható, *E.coli* hősokk promoterét kapcsolták össze az *Aliivibrio fischeri* lux génjével és plazmidba inzertálták. A plazmiddal *E.colit* transzformáltak, így a szennyezőanyagokra rendkívül érzékeny fényemisszióval jelző baktériumot kaptak.

Az *Aliivibrio fischerivel* végzett tesztelés egyik sarkalatos pontja a kísérleti körülmények megfelelő megválasztása. Mivel az *Aliivibrio fischeri* tengeri baktérium, ezért a kísérletek végrehajtásakor 2-3 % NaCl koncentráció fenntartása, az ozmózis nyomás érdekében szükséges. Azonban NaCl hatására megnövekedett ionerősség befolyásolja a fémek kémiai formáját, és ezáltal a toxicitását. Carlson-Ekvall és munkatársa (1995), akik szilárd fázisú mintát (iszap) vizsgáltak, megállapították, hogy Cl^- -ion jelenlétében a fémek kloro-komplex formává alakulnak, megváltoztatva ezzel az eredeti formának megfelelő toxicitást. Ezért az ozmózis nyomás fenntartása érdekében számos egyéb oldatot kipróbáltak: pl. fruktózt, D-glükózt, maltózt, glicerolt, citromsavat, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaClO_4 , Na_2SO_4 stb., amelyek közül a NaClO_4 és a Na_2SO_4 vegyületeket találták a legmegfelelőbbnek. Másik fontos következtetésük, hogy Na^+ -ion jelenléte a mérés során feltétlenül szükséges, mivel a lumineszcencia intenzitása így alig változik. Ezért azok az ozmotikumok amelyek nem tartalmazznak Na^+ -t nem alkalmasak a NaCl helyettesítésére.

A pH szerepét Chou és munkatársa (1992) vizsgálták és megállapították, hogy erősen befolyásolja a nehézfém-formák átalakulását, és ezáltal a fémek hozzáférhetőségét. Ahogy fémek hozzáférhetőségét a pH, a szervesanyagok felvehetőségét a hidrofób szennyezőanyagok jelenléte megváltoztathatja, ezáltal a mért toxicitás is módosulhat.

Laborgyakorlat

Bevezetés

A módszer a *Aliivibrio fischeri* tengeri baktérium által emittált lumineszcens fény intenzitásának mérésén alapul. Gátló anyag jelenlétében a fényemisszió csökken, amelynek mértékét luminométerrel mérjük.

A teszt elvégezhető fagyasztva szárított vagy frissen átoltott tenyészetrel. Ez utóbbi használatát írja le az alábbi leirat. Ebben az esetben a tesztorganizmus érzékenységét folyamatosan ellenőrizni szükséges.

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, bakteriális, akut toxicitási teszt

Alkalmas: pórusvízre, talajkivonatra és teljes talaj szuszpenziójának vizsgálatára (iszapállag)

Tesztorganizmus: *Aliivibrio fischeri* az EPA és DIN szabványokhoz liofilezett formában kapható, de mikrobiológiai laboratóriumban is könnyen fenntartható.

Végpont: lumineszcencia intenzitáscsökkenése, a minta hígítási sorából EC20 (ED20) és EC50 (ED50) határozható meg.

Szükséges műszer: luminometer

Tesztelés időtartama: 30 perc

Szabványmódszerek:

US EPA Microtox

DIN 38412

Teljes talajra adaptált és direkt kontaktra kidolgozott változat: BME-ABÉT

Alkalmazási területe: előzetes és részletes állapotfelmérés, kockázatfelmérés, remediáció követése, ellenőrzése, utómonitoring

Megjegyzés: jól reprodukálható, viszonylag érzékeny teszt

1. Folyadékfázisú minták vizsgálata

1.1. Inokulumkészítés

Az *Aliivibrio fischeri* törzset folyékony tápoldatban, hűtőben tartjuk fenn, folyamatos átoltással. A vizsgálathoz frissen átoltott tenyészetet használunk. 24 órás, 28 °C-on *Aliivibrio fischeri* tápoldatban történő rázatás után a sejtszuszpenzió használható mérésre. A mérés érzékenysége függ az inokulum kezdeti beütésszámától. Előzetes mérések alapján, LUMAC luminométer használata esetén, ha a beütésszámot 600 000 felett van, célszerű a sejtszuszpenziót hígítani. Az inokulum hígítása 2 %-os NaCl-oldattal történik. A beütésszám 30 perces állás után állandósul, így a felhígított inokulum használható mérésre.

Az inokulum készítéséhez használt tápoldat összetétele a következő:

Aliivibrio fischeri tápoldat (1000 cm³ desztillált vízre számolva):

30 g	NaCl
6,1 g	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
2,75 g	K ₂ HPO ₄
0,204 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0,5 g	(NH ₄) ₂ HPO ₄
5 g	pepton
0,5 g	élesztőkivonat
3 cm ³	glicerin
pH=7,2	

A tápoldat sterilizése autoklávban 121 °C-on, 10 percig történik.

1.2. Vizsgálatokhoz használt Cu-oldat

Mivel a mérés érzékenysége erősen függ a kezdeti beütésszámtól, illetve a hőmérséklettől, a minták mellé standard Cu-sor lumineszcencia gátlását is mérjük. A különböző mérési sorozatok eredményét mindig az aktuális Cu-sorra viszonyítjuk.

Cu-standardok koncentrációja: 25, 50, 100, 200 és 400 ppm. A felhasznált Cu-só: CuSO₄ · 5H₂O. A standardok készítéséhez 2%-os NaCl-oldatot használunk. A mérés kontrolljaként nehézfémet nem tartalmazó 2%-os sóoldat szolgál.

Környezeti vízminták esetén a hígítási sor elkészítése előtt érdemes megmérni a hígítatlan minta lumineszcencia gátlását, ez ugyanis sok esetben szükségtelessé teszi a hígítást. /nem toxikus a minta/.

1.4. A lumineszcencia gátlás meghatározása luminométerrel



Lépések

1. A mérőműszer mintatartóiba $0,2-0,2 \text{ cm}^3$ 1.1. pontban leírt módon előállított inokulumot mérünk.
2. A minta hozzáadása nélkül megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I_0)
3. Az inokulumhoz $0,05 \text{ cm}^3$ -t mérünk a minták felkevert hígításaiból. A standard Cu-sor tagjaiból ugyancsak $0,05 \text{ cm}^3$ -t mérünk be. A kontroll mintához $0,05 \text{ cm}^3$ 2%-os NaCl- oldatot mérünk.
4. 30 perces kontaktidő leteltével megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I_{30})

1.5. A mérés kiértékelése

A mérés értékelése az 1. táblázat alapján történik.

1. táblázat. A folyadékminták értékelése

Minta	I_0	I_{30}	$f=I_{30k}/I_{0k}$	$I_{szám}=f*I_0$	$H\%=100*(I_{szám}-I_{30})/I_{szám}$
kontroll	I_{0k}	I_{30k}			
Cu ₁	I_{0Cu1}	I_{30Cu1}			
Cu ₂	I_{0Cu2}	I_{30Cu2}			
Cu ₃ /mg/	.	.			
Cu ₄	.	.			
Cu ₅	.	.			
minta ₁	I_{0m1}	I_{30m1}			
minta ₂	I_{0m2}	I_{30m2}			
. /ml/	.	.			
.	.	.			
.	.	.			

I_0 - A mintatartóba mért inokulum kezdeti lumineszcencia intenzitása

I_{30} - 30 perccel a minta hozzáadása után mért lumineszcencia intenzitás

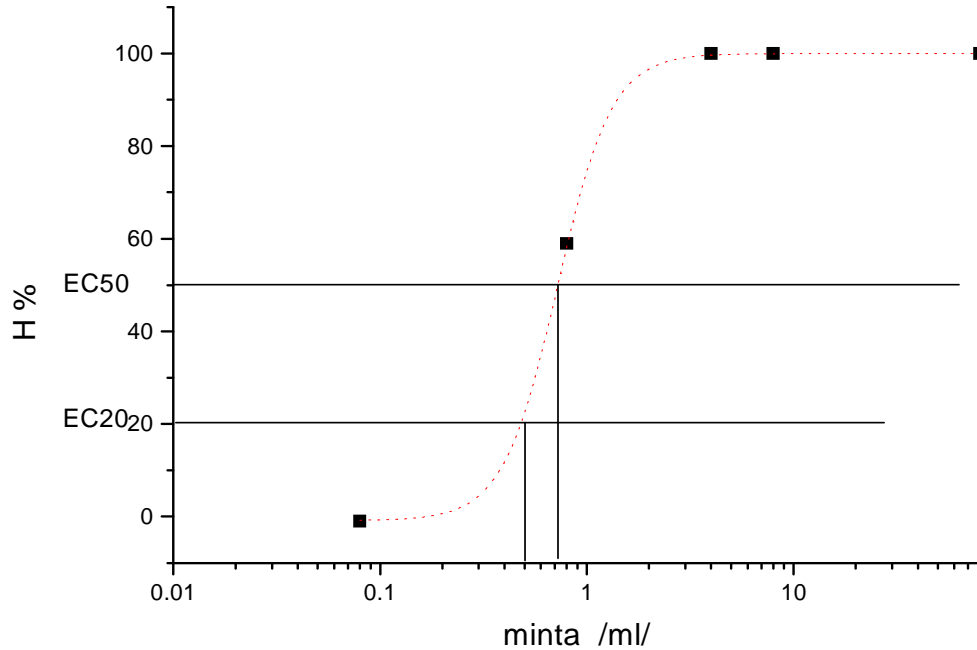
f - A kontroll minta 30. illetve 0. percben mért lumineszcencia intenzitásának hányadosa

I_{szám} - Azon lumineszcencia intenzitás, amelyet a vizsgált minta venne fel 30 perces behatási idő után, ha toxikus anyag nem lenne jelen.

H% - a vizsgált minta okozta %-os lumineszcencia intenzitás-csökkenés

1.5.1. Az EC20 és EC50 értékek grafikus meghatározása

A kiszámolt adatok segítségével egy H% - log bemért anyag [szennyezőanyag koncentráció vagy ml eredeti minta] görbét szerkesztünk, amelyről leolvassuk a 20%-os illetve az 50%-os fényintenzitás csökkenéshez tartozó koncentrációértéket. /lásd 1 ábra/



1. ábra AZ EC20és EC50 értékek grafikus meghatározása

Ezeket EC20 illetve EC50 értéként kezeljük. Cu-sor esetén ugyancsak megszerkesztjük a H%-log(bemért Cu) diagramot, és az EC_{20Cu} illetve EC_{50Cu} értékeket leolvassuk.

1.5.2. Az összegzett gátlás mértékének kifejezése rézegyenértékben (Σ_{Cu}).

A végeredmény megadása Cu-re vonatkoztatva történik a következő módon:

$$\Sigma_{Cu} 20 = \text{Összegzett gátlás } 20 = (EC_{20Cu} / EC_{20minta}) * 10^6 \quad [\text{mg Cu/dm}^3 \text{ minta}]$$

$$\Sigma_{Cu} 50 = \text{Összegzett gátlás } 50 = (EC_{50Cu} / EC_{50minta}) * 10^6$$

2. Szilárd fázisú minták vizsgálata

Bevezetés

A folyadékfázisú mintákkal szemben a szilárdfázisú *Aliivibrio fischeri* teszt számos problémát vet fel.

- Ha a talaj illetve üledékminták ökotoxikológiai vizsgálata azok kivonataiból történik, a nagyfokú hígulás miatt érzékenységcsökkenéssel kell számolni. Ugyanakkor számos a talaj ill. üledék szempontjából fontos kölcsönhatási formát, - szennyezőanyag-talajszemcse, tesztorganizmus-talajszemcse, tesztorganizmus-talajszemcse-szennyezőanyag - nem veszünk figyelembe.

- A minták és a tesztorganizmus direkt érintkezése esetén azonban mérés technikai problémákkal kell számolni. A minta jellegétől függően ugyanis a mintaszuszpenzió zavarossága (fényáteresztő, elnyelő tulajdonsága) különböző lehet. Ez viszont befolyásolja a luminométer fotoelektron-sokszorozójába érkező fény intenzitását. Megoldást jelenthet egy olyan kontroll minta, amely fizikai-kémiai, biológiai jellegét tekintve azonos (nagyon hasonló) a vizsgált talajjal illetve üledékkel, de toxikus anyagot nem tartalmaz. Ez modell-kísérletek esetén megvalósítható (pl. talajtisztítási folyamatok modellezése), egyébként csak ritkán áll rendelkezésre szennyezetlen kontroll. Természetesen választható egy biztosan szennyezetlen standard talaj/üledék, esetleg talaj/üledék sorozat, ez azonban ritkán feleltethető meg teljesen a vizsgált talajjal illetve üledékkel.

- Szilárd fázisú minták esetén is problémát okoz, hogy a teszt érzékenysége erősen függ a sejtsuszpenzió által emittált fény intenzitásától. Ezért minden mérés sorozathoz egy standard Cursor adagolása szükséges, amelynek segítségével a végeredmény Cu-egyenértékben adható meg, így a különböző mérés sorozatok eredményei egymással összehasonlíthatók.

Ez a kalibrációs eljárás, melynek segítségével a tesztek eredményét rézekvivalensben adjuk meg, segíti az ökotoxikológiai eredmények összehasonlíthatóságát, a hatáson alapuló határértékekhez, a remediáció célértékéhez való viszonyíthatóságát. A toxicitás ekvivalens lényege az, hogy akkora hatásról van szó, amekkorát a kalibráláshoz felhasznált, ugyanakkora gátlásnál leolvasott rézvegyület koncentráció okozott volna.

2.1. Inokulumkészítés

Az inokulum készítése az 1.1. pontban leírt módon történik.

2.2. Mintaelőkészítés

A mintákat szobahőmérsékleten szárítjuk, majd dörzsmozárban aprítjuk.

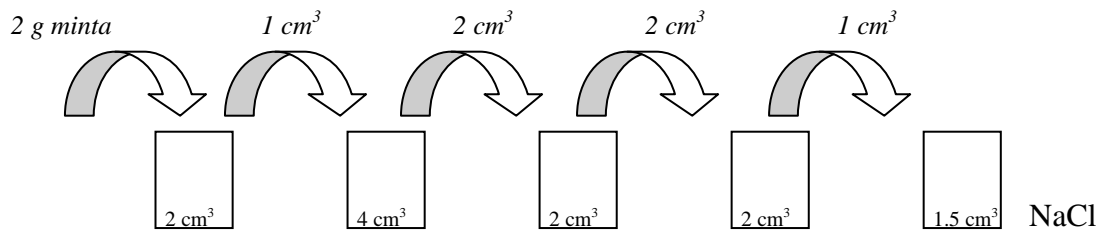
2.3. Vizsgálatokhoz használt Cu-oldat

A szilárd fázisú környezeti minták esetén is a különböző mérési sorozatok eredményét mindig az aktuális Cu-sorra viszonyítjuk.

Cu-standardok koncentrációja: 20, 40, 80, 120, 160, 200 és 400 ppm. A felhasznált Cu-só: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A standardok készítéséhez 2%-os NaCl-oldatot használunk. A mérés kontrolljaként nehézfémeket nem tartalmazó 2%-os sóoldat szolgál.

2.4. A minták hígítási sorának készítése

A) talaj, üledék



2. ábra Hígítási sor (A)talaj, üledék)

A hígítás 2%-os NaCl-oldattal rendszeres keverés mellett történik. A mérés kezdete előtt 30 percig állni hagyjuk a hígítási sor tagjait.

2.5. A lumineszcencia gátlás meghatározása luminométerrel

Lépések

1. A mérőműszer mintatartóiba $0,2-0,2 \text{ cm}^3$ 2.2. pontban leírt módon előállított inokulumot mérünk.
2. A minta hozzáadása nélkül megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I_0)
3. Az inokulumhoz $0,05 \text{ cm}^3$ -t mérünk a minták felkevert hígításaiból. A standard Cu-sor tagjaiból ugyancsak $0,05 \text{ cm}^3$ -t mérünk be. A kontroll mintához $0,05 \text{ cm}^3$ 2%-os NaCl- oldatot mérünk.

3.a. Nem rendelkezünk szennyezetlen kontroll mintával

A minták hozzáadása a 3. ábra szerinti sorrendben történik. A minta hozzáadása után azonnal mérjük a lumineszcencia intenzitását (I_1). Az I_1 az adott minta kontrolljaként szolgál, feltételezve

azt, hogy a hozzáadás pillanatában a minta még nem fejt ki gátló hatást. Bizonyos esetekben a feltételezés nem helyes, mivel a toxikus anyag pillanatszerűen fejt ki hatását, amit a kiértékeléskor figyelembe kell venni.

3.b. Rendelkezünk szennyezetlen kontroll mintával

Az inokulumhoz a vizsgálandó minta hígításai mellé a szennyezetlen kontroll ugyanolyan módon készült hígításait mérjük. Ebben az esetben nincs szükség azonnali mérésre.

4. 30 perces kontaktidő leteltével megmérjük a lumineszcencia intenzitását. (I_{30})

2.6. A mérés kiértékelése

A mérés értékelése a 2.(3.a. eset) és a 3. (3.b. eset) táblázatok alapján történik.

2.6.1. Az EC20 (ED20) és az EC50 (ED50) grafikus meghatározása

A kiszámolt adatok segítségével egy H% - log bemért anyag [mg szárazanyag] görbét szerkesztünk, amelyről leolvassuk a 20%-os illetve az 50%-os fényintenzitás csökkenéshez tartozó koncentráció- ill. dózisértékeket. (lásd. 1. ábra) Ezeket EC20 (ED20) illetve EC50 (ED50) értéként kezeljük. Cu esetén ugyancsak megszerkesztjük a H% - log(bemért mg Cu) diagramot, és az EC_{20Cu} illetve EC_{50Cu} értékeket leolvassuk.

2.6.2. Az összegzett gátlás mértékének kifejezése rézegenértékben. (Σ_{Cu})

A végeredmény megadása Cu-re vonatkoztatva történik a következő módon:

$$\Sigma_{Cu} 20 = \text{Összegzett gátlás } 20 = (EC_{20Cu} / EC_{20minta}) * 10^6 \quad [\text{mg Cu/kg minta}]$$

$$\Sigma_{Cu} 50 = \text{Összegzett gátlás } 50 = (EC_{50Cu} / EC_{50minta}) * 10^6$$

A talajminták toxikusságának jellemzése *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia teszt eredménye alapján

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

A jegyzőkönyvben szerepeljen:

- néhány soros bevezető
- a gyakorlat lépései (mit miért hogyan csináltunk)
- kiértékelés: táblázat, koncentráció-dózis válasz görbék
- rézgyenérték számítása

Irodalom

Cairns, J., Pratt, R. (1989) The scientific basic of bioassays, *Hydrobiologia* 188/189:5-20

Calow P. (1993) Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science Ltd.

Camusso M., Balestrini R., Muriano F., Mariani M. (1994) Use of fresh-water mussel *dreissena-polymorpha* to assess trace-metal pollution in the lower river Po (Italy), *Chemosphere*, 29(4):729-745

Chou CK, Hsu SL, Lin YF (1992) Transcriptional regulation of transferrin and albumin genes by retinoic acid in human hepatoma cell line Hep3B. *Biochem. J.* 283(2)611–5.

B.E. Carlson, Macke, A., M.I. Mishchenko, K. Muinonen, (1995) Scattering of light by large nonspherical particles: Ray tracing approximation versus T-matrix method. *Opt. Lett.*, 20:1934-1936, doi:10.1364/OL.20.001934.

Berger B., Dallinger R. (1993) Accumulation of cadmium and copper by the terrestria snail *Arianta arbustorum* L.: kinetics and budgets, *Oecologia* 79(1):60-65

Gruiz K., Horváth B., Kriston É. (1995/a) Talajtisztítási biotechnológiák I. – Gazdaság és Gazdálkodás XXXIII 1. 21-26

Gruiz K., Horváth B., Kriston É. (1995/b) Talajtisztítási biotechnológiák II. – Gazdaság és Gazdálkodás XXXIII 2. 15-18

Gruiz Katalin, Horváth Beáta és Molnár Mónika (2001) Környezettoxikológia. Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára, Műegyetemi Kiadó

Kwan K.K., Dutka B.J. (1990) Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays, *Tox.Assess.* 5:395-404

Lee CP, Seong BL, RajBhandary UL (1991) Structural and sequence elements important for recognition of *Escherichia coli* formylmethionine tRNA by methionyl-tRNA transformylase are clustered in the acceptor stem. *J Biol Chem.* 266(27):18012–18017

Legault R., Blaise C. Rokosh D., Chong-Kit R. (1994) Comparative assessment of the SOS Chromotest Kit and the Mutatox Test with the *Salmonella* Plate Incorporation (Ames) and Fluctuation Tests for Screening Genotoxic Agents, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 45-57

Mayer F.L., Mayer K.S., Ellersiech, M.R. (1986) Relation of survival to other endpoints in chronic toxicity tests with fish, *Environ.Toxicol.Chem.* 5:737-748

Spellerberg I.F. (1991) Monitoring Ecological Change, Cambridge University Press, Cambridge

E. A. Meighen (1988) Enzymes and Genes from the lux Operons of Bioluminescent Bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 42:151-176

Suter G. (1989) Ecological end-point, In: Ecological Assessment of Hazardous Waste Site: Field and Lab Reference Document (Eds.: W.Waren-Hicks, B.R. Parkhurst and S.S. Baker), EPA 600/3-89/013. US EPA, Corvallis, OR

Steinberg SM, Poziomek EJ, Englemann WH, Rogers KR (1995) A review of environmental

applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere* 30:2155–2197

Torslov J. (1993) Comparison of bacterial toxicity tests based on growth, dehydrogenase activity, and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*, *Ecotox. Environ. Safety* 25:33-40

Van Cappelleveen H.E. (1995) Risk Assessment for Nature development on Polluted Soils, In: *Contaminated Soil '95* pp.603-604. Eds.: van den Brink, W.J., Bosman, R., Arendt, F. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Van Dyk TK, Majarian WR, Konstantinov KB, Young RM, Dhurjati PS, LaRossa RA. (1994) Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl Environ Microbiol.* 60(5):1414–1420

Vargha B. (1991) Az ökotoxikológiai vizsgálatok jelentősége és javasolt fejlesztési irányai a környezetegészségügy területén, *Egészségtudomány* 35:99-111

Xu H., Dutka B.J. (1987) ATP-TOX System- A new, rapid, sensitive bacterial toxicity screening system based on determination of ATP, *Tox. Assess.* 2: 149-166

Xu H., Dutka B.J., Kwan K.K. (1987) Genotoxicity studies on sediments using modified SOS Chromotest, *Tox. Assess.* 2: 79-87

Kiértékelés a 3.a. esetben

Minta	I_0	I_1	I_{30}	$Iszám_0=f_0 \cdot I_0$	$Iszám_1=f_1 \cdot I_1$	$H\% = 100 \cdot (Iszám_k - I_{30}) / Iszám_k$
kontroll						
Cu ₁						
Cu ₂						
Cu ₃						
Cu ₄						
Cu ₅						
1 minta ₁						
1 minta ₂						
1 minta ₃						
1 minta ₄						
1 minta ₅						

Kiértékelés a 3.b. esetben

Minta	I_0	I_{30}	f_{sz}, f_0	Iszám	$H\% = 100 * (Iszám - I_{30}) / Iszám$
kontroll					
Cu ₁ Cu ₂ Cu ₃ Cu ₄ Cu ₅			$f_0 = I_{30k} / I_{0k}$	$Iszám = f_0 * I_{0Cu}$	
szilárd kontroll ₁ sz kontroll ₂ sz. kontroll ₃ sz. kontroll ₄ sz. kontroll ₅			$f_{sz1} = I_{30szk1} / I_{0szk1}$ $f_{sz2} = I_{30szk2} / I_{0szk2}$ $f_{sz3} = I_{30szk3} / I_{0szk3}$. .		
1 minta ₁ 1 minta ₂ 1 minta ₃ 1 minta ₄ 1 minta ₅				$Iszám_1 = f_{sz1} * I_{01m1}$ $Iszám_2 = f_{sz2} * I_{01m1}$. . .	