Tartalomjegyzék

1. Bevezetés 1
1.1. Bevezetés és célkitűzés 1
1.2. Ivóvíz és ivóvíztisztítási technológiák 1
1.2.1. Az ivóvíz 1
1.2.2. Ivóvíztisztítási technológiák 2
1.3. Tisztítás után megmaradó melléktermékek 3
1.3.1. A melléktermékek bemutatása 3
1.3.2. Egészségügyi hatások, veszélyek 4
1.3.3. A 4-etil-benzaldehid, mint vízfertőtlenítési melléktermék vizsgálat 5
1.4.Toxikológiai vizsgálatok 6
1.5. Genotoxicitás tesztek 8
1.5.1. Genotoxikológia, genotoxicitás 8
1.5.2. A genotoxikológiai vizsgálatok eszközei 9
1.5.3. Néhány fontosabb genotoxicitás teszt bemutatása 9
1.6. A zebradánió 11
1.6.1. A faj jellemzése 11
1.6.2. A zebradánió, mint toxikológiai modellállat 11
1.7. Comet assay 13
1.7.1. A módszer bemutatása 13
1.7.2. A Comet assay módszer fejlődése 14
1.7.3. A Comet assay alkalmazása 15
1.7.4. A módszer korlátai 16
1.8. RAPD PCR módszer 17
1.8.1. A RAPD módszer bemutatása 17
1.8.2. A RAPD alkalmazása 18
1.8.3. A RAPD előnyei és korlátai 19
1.8.4. A RAPD, mint genotoxicitást vizsgáló módszer 20
2. A vizsgálatok módszerei 21
2.1. Zebradánió tartása 21
2.2. Embriótoxicitás vizsgálat (Fish Embryo Toxicity Test-FET) menete 21
2.2.1. Statisztikai értékelés 22
2.3. Comet assay vizsgálat menete 22

2.3.1. Statisztikai értékelés 24
2.4. RAPD PCR vizsgálat menete 25
2.4.1. DNS tisztítás 25
2.4.2. DNS koncentráció és tisztaság meghatározása 25
2.4.3. RAPD PCR reakció 25
2.4.4. Agaróz gélelektroforézis 26
2.4.5. Adatok értékelése, statisztika 26
3. Eredmények 27
3.1. Embriótoxicitás (FET) teszt eredményei 27
3.2. Comet assay vizsgálat eredményei 29
3.3. RAPD vizsgálat eredményei 30
4. Értékelés és következtetések 33
5. Összefoglalás 34
6.Köszönetnyilvánítás
7. Irodalomjegyzék
8. Függelék

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőimnek, Csenki-Bakos Katalinnak és Bencsik Dórának, hogy lehetőséget biztosítottak munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm segítőkész támogatásukat, dolgozatom alapos és kritikus átnézését továbbá, hogy hozzájárultak szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz.

Köszönöm a vizsgálatokban nyújtott segítségét a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszék munkatársainak, Reining Mártának és Uri Csillának.

Köszönöm a támogatását mindenkinek, aki hozzájárult ahhoz, hogy dolgozatom elkészülhessen.

Köszönöm a lehetőséget, hogy vizsgálataim elvégzéséhez a Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszék és a Szent István Egyetem Regionális Egyetemi Tudásközpont (RET) biztosította a helyszínt és a szükséges felszerelést.

7. Irodalomjegyzék

Anana, R. D., Ng, H., Howlett, S. E. & Knaus, E. E. (1997): Synthesis and smooth muscle calcium channel effects of dialkyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-aryl-3,5-pyridinedicarboxylates containing a nitrone moiety in the 4-aryl substituent. Archiv der Pharmazie, 330(3): 53-58.

Atienzar, F.A. & Jha, A. N. (2006): The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Mutation Research, 613(2-3): 76-102.

Bardacki, F. (2001): Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Turkish Journal of Biology, 25(1): 185-196.

Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F. & Castano, A. (1999): Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. Mutagenesis, Vol: 14(5): 449-456.

Beddowes, E. J., Faux, S. P. & Chipman, J. K. (2003): Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. Toxicology: 187 (2-3): 101–115.

Boorman, G. A., Dellarco, V., Dunnick, J. K., Chapin, R. E., Hunter, S., Hauchman, F., Gardner, H., Cox, M. & C. Sills, R. C. (1999): Drinking Water Disinfection Byproducs: Review and Approach to Toxicity Evaluation. Environmental Health Perspectives, 107 (1): 207-217.

Csenki ZS., Müller F., Magyary I., Horváth Á. & Urbányi B. (2006): A zebradánió (Danio rerio), mint a modern biotechnológia modellállata: jelenlegi helyzet jövőbeli lehetőségek. Állatbiotechnológiai Kutatások Magyarországon Konferencia. MTA székház, Budapest, 29. szeptember 2006., 19 p.

Doerjer, G., Buchholz, U., Kreuzer, K. & Oesch, F. (1988): Biomonitoring of DNA damage by alkaline filter elution. International Archives of Occupational and Environmental Health, 60(3), 169-174.

Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V. & Arlett, C.F. (1992): UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. Mutation Research, 273(2): 137-144.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicological Sciences, 86(1): 6-19.

Horn, P. & Zsilinszky, S. (1983): Akvarisztika. Natura Kiadó, Budapest, 188-191 p.

Kimmel, B.C., Ballard, W.W., Kimmel, R.S., Ullmann, B., Schilling, F.T., (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. Developmental Dynamics, 203(3): 253–310.

Krane, D. E., Sternberg, D. C. & Burton, G. A. (1999). Randomly amplified polymorphic DNA profile based measures of genetic diversity in crayfish correlated with environmental impacts. Environmental. Toxicology and Chemistry, 18(3): 504 - 508.

Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M. L., Blatchley III, E. R. & Pommepuy, M. (1999): Advanced wastewater disinfection technologies: State of the art and perspectives. Water Science and Technology, 40(4-5): 203-213.

Lehel J. & Laczay P. (2011): Toxikológia. SZIE jegyzet, Gödöllő, 268 p.

McKelvey-Martin, V.J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P. & Collins, A. (1993): The single cell gel electrophorsis assay (comet assay): a European review. Mutation Research, 288(1): 47-63.

Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L. & Trede, N. S. (2007): Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. Biotechniques, 43(5): 610-614.

Mohanty, G., Mohanty, J., Jena, S. D., & Dutta, S. K. (2011). Genotoxicity Testing in Pesticide Safety Evaluation. In: Margarita Stoytcheva (ed.): Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. InTech, Rijeka, 614 p., 403-426 p.

Nagel, R. (2002): DarT: The EmbryoTest with the Zebrafish Danio rerio – a general model in ecotoxicology and toxicology, Altex, 19(1): 38–48.

Nieuwenhuijsen, M. J., Grellier, J., Smith, R., Iszatt, N., Bennett, J., Best, N. & Toledano, M. (2009): The epidemiology and possible mechanisms of disinfection by-products in drinking water. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Physical, Mathematical and Engineering Sciences. 367(1904): 4043–4076.

Olive, P. L. & Banáth, J. P. (2006): The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nature Protocols, 1(1): 23-29.

Olive, P.L., Banáth, J.P. & Durand, R.E. (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Radiation Research, 122(1): 69-72.

Östling, O., & Johanson, K.J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123(1): 291−298.

Paull B. & Barron L. (2004): Using ion chromatography to monitor haloacetic acids in drinking water: a review of current technologies. Journal of Chromatography A, 1046(1–2): 1-9.

Plewa, M. J., Wagner, E. D., Muellner, M. G., Hsu, K. M. & Richardson, S. D. (2008): Comparative mammalian cell toxicity of N-DBPs and C-DBPs. In: Karanfil, T., Krasner, S. W., Westerhoff, P., Xie, Y., (eds.): Occurrence, formation, health effects and control of disinfection byproducts in drinking water. American Chemical Society, Washington D.C., 384 p., 36–50 p.

Postlethwait, J. H., Johnson, S. L., Midson, C. N., Talbot, W. S., Gates, M., Ballinger, E. W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., Eisen, J. S., Horne, S., Kimmel, C. B., Hutchinson, M., Johnson, M. & Rodriguez (1994): A genetic map for the zebrafish. Science, 264(5159): 699-703.

Rácz G., Sujbert L., Bocsi J. & Szende, B. (2004): Rapid communication: water disinfection byproducts enhanced apoptotic activity in human lymphocytes. Journal of Toxicology and Environmental Health, 67(17): 1315–1319.

Rácz G., Sujbert, L., Urbányi, B., Zsákovics, I., Baska F., Csenki Zs., Gustafson R., Hegyi Á., Kis R., Kovács R. & Szende B. (2012): Subacute toxicity assessment of water disinfection byproducts on zebrafish. Pathology oncology research, 18(3): 579-84.

Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R. & DeMarini, D. M. (2007): Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. Mutation Research, 636(1-3): 178–242.

Rook, J. J. (1974): Formation of haloforms during chlorination of natural waters. Water Treatment Examination, 23(2): 234–243.

Rydberg, B. & Johanson, K.J. (1978): Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt, P.C., Friedberg, E.C. & Fox, C.F. (eds.): DNA Repair Mechanisms. Academic Press, New York, 813 p., 465-468 p.

Savva, D., Castellani, S., Mattei, N., Renzoni, A. & Walker, C. H. (1994): The use of PCR and DNA fingerprints to detect the genotoxic effects of environmental chemicals. In: S.P. Varnavas (ed.): Proceedings of the 6th International Conference on Environmental Contamination, Delphi, Greece, CEP Consultants, Edinburgh. 1994., 105-110 p.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175(1): 184−191.

Spitsbergen, J. M. & Kent, M. L. (2003): The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research- Advantages and Current Limitations Toxicologic Pathology, 31(1): 62-87.

Sujbert, L., Rácz, G., Szende, B., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. & Török, G. (2006): Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames test. Toxicology, 219(1-3): 106-112.

Szilágyi, F.(2005): Mérnökökológia. BME ÉK VKKT jegyzet, Budapest, 118 p.

Thouand G., (2011): Microorganisms for analysis. Analytical and Bioanalitical Chemistry, 400(4): 893-894.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. & Sasaki, Y. F. (2000): Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35(3): 206–21.

van Amerongen, R. & Nusse, R. (2009): Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Development, 136(19): 3205-32014.

Westfall, T., A., Brimeyer, R., Twedt, J., Gladon, J., Olberding, A., Furutani-Seiki, M. & Slusarski, D. C. (2003): Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/β-catenin activity. JCB, 162(5) 889-898.

Villanueva, C. M., Cantor, K. P., Grimalt, J. O., Malats, N., Silverman, D., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Castaño-Vinyals, G., Marcos, R., Rothman, N., Real F.X., Dosemeci, M. & Kogevinas, M. (2007): Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering and swimming in pools. American Journal of Epidemiology, 165(2): 148–156.

Williams, J. G.K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18(22): 6531-6535.

Žegura, B., Filipič, M., (2004): Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing. In: Yan, Z. & Caldwell, G. (ed.): Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods (Methods in Pharmacology and Toxicology). Humana Press, Totowa, N.J., 418 p., 301–313 p.

Internetes hivatkozások:

http1: http://www.csepp-viz.hu/2-ivoviz (2013.09.23.)

http2: http://www.vizinform.hu/oldal.php?page=9 (2013. 09.23.)

http3: http://vizmuvek.hu/hu/fovarosi-vizmuvek/tarsasagi-informaciok/a_vizrol/altalanos_informacio_a_vizrol/az_ivoviz (2013. 09.23.)

http4: http://www.epito.bme.hu/vcst/oktatas/feltoltesek/BMEEOVK-SP1/viztisztitas_jegyzet.pdf (2013.09.25.)

http5: http://www.nesc.wvu.edu/ndwc/pdf/OT/TB/TB1_Disinfection.pdf (2013.09.25.)

http6: http://www.molar.hu/pdf/bt01460.pdf (2013.09.24.)

http7:http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=HU&language=hu&productNumber=W375608&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fw375608%3Flang%3Dhu (2013. 09.24.)

http8:http://www.nuffieldbioethics.org/sites/default/files/files/Animals%20Chapter%209%20Animal%20Use%20in%20Toxicity%20Studies.pdf (2013. 10.02.)

http9:http://www.nuffieldbioethics.org/sites/default/files/files/Animals%20Chapter%209%20Animal%20Use%20in%20Toxicity%20Studies.pdf (2013. 10.02.)

http10: http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071247-en (2013. 09.27.)

http11: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1946914.pdf (2013.10.03.)

http12: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhabition-test_9789264016194-en (2013. 10.03.)

http13: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en (2013.10.03.)

http14: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en (2013. 10. 04.)
http15: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en (2013.10.04.)
http16: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-210-fish-early-life-stage-toxicity-test_9789264203785-en (2013. 10.06.)
http17: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-212-fish-short-term-toxicity-test-on-embryo-and-sac-fry-stages_9789264070141-en (2013. 10.06.)
http18: http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071261-en (2013. 09.27.)
http19: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-476-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-test_9789264071322-en (2013.09. 27.)
http20: http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071285-en (2013. 09.27.)
http21: http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071384-en (2013.09.27.)
http22: http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071407-en (2013.09.27.)
http23: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264091016-en (2013. 09.27.)
http24: http://www.iucnredlist.org/details/166487/0 (2013.09.12.)
http25:http://www.fishbase.org/summary/4653 (2013.09.12.)
http26: http://www.benchfly.com/blog/model-organism-week-researchs-next-top-model/ (2013.09.12.)
http27: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRAPD.shtml (2013.09.17.)

Ábrák forrásai:

httpA: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/Comet-assay.gif (2013. 10. 13.)
httpB: http://portal.faf.cuni.cz/getattachment/Groups/Clinical-physiology-of-nutrition-and-metabolism/Research/Comet-assay.jpg.aspx (2013.10.13.)

8. Függelék

1. táblázat: LC_{50} és LC_{10} értékek

	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**
LC_{50} (mg/l)	31,43	30,83	27,52	22,01	18,44
LC_{10} (mg/l)	26,91	23,03	18,81	14,82	8,49

2. táblázat: A RAPD mintázat megváltozása különböző koncentrációkban alkalmazott 4-etil-benzaldehid (4-EBA) kezelés hatására, 5 napos zebradánió embriókban. Az eltérést mutató eredményeket szürkével jelöltük. A genomi DNS stabilitásának meghatározásához csak a sötétszürkével jelölt adatokat használtuk fel. (N.A.: nincs elég adat az értékeléshez)

Primer azonosí-tója	RAPD profil megváltozása	kezelés				
		120 óra				
		0,5 mg/l 4-EBA	1 mg/l 4-EBA	5 mg/l 4-EBA	10 mg/l 4-EBA	12 mg/l 4-EBA
UBC 102	új fragmentek száma	0	N.A.	0	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	1	N.A.	1	1	N.A.
UBC 103	új fragmentek száma	1	1	1	1	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	3
UBC 105	új fragmentek száma	1	0	1	2	7
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	0
UBC 106	új fragmentek száma	1	1	1	1	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	1
UBC 107	új fragmentek száma	2	2	2	2	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.
UBC 108	új fragmentek száma	0	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	3
UBC 109	új fragmentek száma	1	0	0	1	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	1	0	6
UBC 110	új fragmentek száma	0	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	0
UBC	új fragmentek száma	2	3	2	3	0

111	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	1
UBC 112	új fragmentek száma	1	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	1	1
UBC 113	új fragmentek száma	Nem keletkezett termék.				
	eltűnt fragmentek száma					
UBC 114	új fragmentek száma	0	0	1	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	0
UBC 115	új fragmentek száma	0	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	2
UBC 116	új fragmentek száma	1	1	0	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	0	1	1	N.A.
UBC 117	új fragmentek száma	Értékelhetetlen.				
	eltűnt fragmentek száma					
UBC 118	új fragmentek száma	Nem keletkezett termék.				
	eltűnt fragmentek száma					
UBC 119	új fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.
UBC 120	új fragmentek száma	0	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	1	1	5
UBC 121	új fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	3	3	3	N.A.
UBC 122	új fragmentek száma	0	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	0	0	1	1	4
UBC 124A	új fragmentek száma	0	0	0	0	0
	eltűnt fragmentek száma	4	2	1	2	2
UBC 124B	új fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	2	2	2	N.A.
UBC 125	új fragmentek száma	0	0	2	2	1
	eltűnt fragmentek száma	0	1	0	0	0
UBC 126	új fragmentek száma	0	0	5	5	7
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	0

UBC 127	új fragmentek száma	Értékelhetetlen.				
	eltűnt fragmentek száma					
UBC 128	új fragmentek száma	3	2	2	2	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	0
UBC 129	új fragmentek száma	0	0	N.A.	3	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	1	0	N.A.	0	N.A.
UBC 130	új fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.
	eltűnt fragmentek száma	0	0	0	0	N.A.