

XXXII. OTDK Biológia Szekció

KÜLÖNBÖZŐ SZEMCSEMÉRETŰ CINK-OXID HATÁSA A *FOLSOMIA CANDIDA* ÉS A
PANAGRELLUS REDIVIVUS TALAJÁLLATOKRA

Kiss Lola Virág
Ökotoxikológus
II. évfolyam
Szent István Egyetem

Belső konzulens: Seres Anikó
Belső konzulens: Hrács Krisztina

Gödöllő
2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Nanoanyagok.....	4
2.1.1. Csoportosításuk.....	4
2.1.2. Tulajdonságaik.....	6
2.1.3. Felhasználásuk	7
2.1.4. Nanoanyagok kockázata, kockázatbecslése.....	7
2.2. Cink-oxid és nano cink-oxid	8
2.3. A talaj és a talaj élőlények szerepe.....	10
2.4. Tesztállatok bemutatása	11
2.4.1. Fonálférgek (<i>Nematoda</i>).....	11
2.4.2. Ugróvillások (<i>Collembola</i>)	13
2.5. Ökotoxikológiai vizsgálatok talajállatokkal	14
2.5.1. Vizsgálatok <i>Folsomia candida</i> ugróvillással.....	14
2.5.2. Vizsgálatok fonálférgekkel.....	15
3. Anyag és módszer	16
3.1. Felhasznált anyagok	16
3.2. <i>Folsomia candida</i> tesztfajjal végzett tesztek.....	19
3.2.1. Előkísérletek	19
3.2.2. Főkísérlet	20
3.3. <i>Panagrellus redivivus</i> tesztfajjal végzett teszt	21
3.4. Statisztikai módszerek.....	22
4. Eredmények.....	23
4.1. <i>Folsomia candida</i> fajjal végzett kísérletek eredményei	23
4.1.1. Előkísérletek	23
4.1.2. Főkísérlet	26
4.2. <i>Panagrellus redivivus</i> fajjal végzett kísérlet eredményei.....	29
5. Értékelések, következtetések.....	32
6. Összefoglalás.....	33

1. Bevezetés és célkitűzések

A nanotechnológia az utóbbi években mindennapjaink részévé vált. A XXI. század egyik leggyorsabban fejlődő iparága. A termékeit felhasználhatják a kozmetikai-, a gyógyszer-, az elektronikai- és az élelmiszeriparban is. A felhasználás során a méret csökkenésből adódó, megváltozott tulajdonságokat használják ki, viszont a lehetséges hátrányaival és veszélyeivel, sokkal kisebb mértékben foglalkoznak. Az egészségügyi, környezetvédelmi és ökológiai hatásaival jóval kevesebb tanulmány foglalkozik, mint a lehetséges új felhasználási területekkel. A legtöbb nanoméretű anyagnak a környezeti kockázata még felderítetlen, viszont már több éve használatban vannak. A nanoanyagok ökototoxicitására még kevesebb adatot találhatunk.

Vizsgálataimban a nano és a nagyszemcsés cink-oxid (ZnO) hatását teszteltem két talajlakó szervezeten, a *Folsomia candida* ugróvilla fajon és a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajon. A ZnO-ot azért választottam, mint vizsgálati anyag, mert sokoldalúsága és kompatibilitása miatt számos területen felhasználhatják például környezeti kármentesítésre, termékek adalékanyagaiként, élelmiszerekben, kozmetikai szerekben és naptejekben, a kiváló fotokatalitikus tulajdonságai miatt.

A szárazföldi, talajlakó állatokra kevés teszt született eddig és olyan, amiben több szervezet érzékenységét vizsgálták együtt, még kevesebb. Mindkét tesztállat megfelelő a ZnO-dal végzett laboratóriumi tesztekhez, hisz könnyen tarthatóak, szaporíthatóak, kis helyet igényelnek, megfelelő az érzékenységük az anyagra és a környezeti relevanciájuk is magas. A ZnO-dal nem csak teszt körülmények között találkozhatnak, hisz a felhasználása során nemcsak a háztartási, ipari hulladékkal és a szennyvízzel kerülhet be a talajba, hanem közvetlenül is kijuttathatják.

A dolgozatomban a következő kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

- Van-e különbség a nagy szemcseméretű és a nano ZnO toxicitásában?
- A nanoanyagoknál a szemcseméretnek van-e szignifikáns hatása a tesztállatokra?
- A vizsgált talajszervezetek közül, melyik érzékenyebb a nano ZnO-ra?
- A *Folsomia candida* ugróvilla faj esetén befolyásolja-e a toxicitást a ZnO expozíciós útvonala?

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Nanoanyagok

A nano előtag a görög nánosz szóból ered, jelentése törpe. Az Európai Bizottság 2012-es közleményében fogalmazza meg a nanoanyagok pontos definícióját: „a nanoanyag olyan természetes anyag, szándékolatlanul előállított mesterséges anyag vagy szándékosan előállított anyag, amely nem kötött állapotban, aggregátum formájában vagy agglomerátum formájában olyan részecskéket tartalmaz, amelyeknek legalább egy külső mérete a részecskének a darabszám szerinti méreteloszlás alapján vett legalább 50 %-a esetében az 1 nm-től 100 nm-ig terjedő mérettartományba esik. Konkrét esetekben, továbbá akkor, ha azt környezetvédelmi, egészségügyi, biztonsági vagy versenyképességi szempontok indokolják, a darabszám szerinti méreteloszláshoz tartozó 50 %-os küszöbérték helyett 1 %-nál nagyobb, de 50 %-nál kisebb küszöbérték alkalmazható.” A globális szinten forgalomban lévő nanoanyagok éves össz mennyisége kb. 11 tonna (EURÓPAI BIZOTTSÁG 2012). A nanorészecskék kis méretéből adódóan nagy a fajlagos felületük, valamint nagy a reakciókészségük. Nanotartományban újszerű fizikai és kémiai tulajdonságok alakulnak ki.

A nanotechnológia célja a nanométeres tartományba eső eszközök, anyagok előállítása, fejlesztése és alkalmazása. A nanotudomány viszont az ebbe a tartományba eső anyagok tulajdonságait vizsgálja, beleértve a vizsgálati módszereket és azok fejlesztését is (BÁNYAI 2009).

2.1.1. Csoportosításuk

A nanoanyagokat több szempont szerint tudjuk csoportosítani. A három főbb csoportosítási kategória a keletkezés, a kémia struktúra és a dimenziószám.

A nanorészecskék keletkezhetnek természetes vagy emberi (antropogén) úton, célzott előállítás során vagy melléktermékként. A természetes eredetű nanoanyagok lehetnek folyékony, szilárd és gáz halmazállapotúak is. Létrejöhetnek közetmállás (elsősorban fém-oxidok), erdőtüzek és vulkánkitörések során. Ezek mellett számos élő szervezet (pl.: vírusok) lebomlása által keletkezhet nanoméretű részecske és az emberi szervezetben is megtalálhatóak ilyen mérettartományú struktúrák (PÁNDICS 2008).

Az emberi tevékenység melléktermékeként keletkező nanoanyagok főképpen a belsőégésű motorok (dízel), erőművek, hulladék és egyéb égetőművek használata során keletkeznek. A grillezésnél és az olajban történő sütésnél is keletkezhetnek nanorészecskék (PÁNDICS 2008).

A tervezett előállításra két technológia létezik. A nagyobb szemcsékből mechanikai és kémiai módszerekkel előállíthatók nanoméretű részecskék, ezt a módszert nevezzük "top-down"-nak. A másik út a kémiai építkezésé ez a "bottom-up" módszer, amikor irányított reakciókkal akkor fejezzük be a szintetikus folyamatot, amikor a képződött anyag a számunkra kívánatos mérettartományba nőtt (BÁNHEGYINÉ TÓTH 2008).

Kémiai struktúra szerint több anyag és vegyület csoportba sorolhatjuk a nanorészecskéket:

- Elemek:
 - Félvezetők: kadmium, tellúr, szilícium
 - Vezetők: arany, ezüst, vas
 - Nem fémek: szén (nanocsövek, fullerén, ipari korom)
- Vegyületek:
 - Szervetlen: fém-oxidok (titán-dioxid, cink-oxid)
 - Szerves: polytetrafluoretilén (PTFE), korom
- Biológiai struktúrák:
 - Liposzómák, micellák

(PÁNDICS 2008).

A nanoanyagokat a dimenziószám szerint is tudjuk csoportosítani. A legegyszerűbb szerkezeteket a D^0 kategóriába sorolhatjuk, ezeket nevezzük nanorészecskékné. Ezek pont-szerű elemek, lehetnek fémek, oxidok, félvezetők és szerves anyagok is. Jellemző rájuk, hogy mind három dimenzióban 100 nm-nél kisebb a kiterjedésük. A következő dimenzió a D^1 , ahova a lineáris nanoszerkezetek tartoznak, az átmérő nanotartományú, a hossz viszont mikrométeres vagy milliméteres is lehet. Lehetnek nanocsövek, nanodrótok és egyéb hasonló szerkezetek (BÁNHEGYINÉ TÓTH 2008). Jellemző rájuk a rendkívüli szilárdság, kiváló adszorpciós képesség, vezető, félvezető és szigetelő is lehet (ZSENI 2010). A nanoporozitás, nanoszűrés (D^2) dimenziószáma nehezen definiálható. Ide tartozhatnak például a réteges anyagásványok, réteges nanolemezek, nanopórusú anyagok (BÁNHEGYINÉ TÓTH 2008).

2.1.2. Tulajdonságaik

A nano mérettartományban az anyagok fizikai, kémiai és mechanikai tulajdonságaik lényegesen megváltoznak. A méret csökkenésével nő a fajlagos felület, viszont a tömeg nem változik. A nanorészecskék tartalmazzak egy alcsoportot, az úgynevezett kolloidok tartoznak ide (CATTANEO et al. 2009). A nanoszemcsék színe is megváltozhat a nagyszemcsés anyaghoz képest például az aranytömb színe sárgás, viszont a nanorészecskék vörösesek. Az anyagok oldhatósága, forráspontja, reakcióképessége, katalitikus aktivitása is megváltozhat a nanométeres tartományban. A nanoanyagokra jellemző még az önszerveződés, amelyben egyes elemek rendezetlen halmaza magától rendezett mintázattá szerveződik, a részecskék közötti kölcsönhatások következtében. A folyamat során új tulajdonságok és funkcionális képességek keletkezhetnek (HTTP 1.). A megnövekedett fajlagos felület és a reakcióképesség megkönnyítheti a biológiai elérhetőségét és megnövelheti a toxicitását az anyagoknak. A nanoanyagok ökotoxicitására vonatkozóan kevés adatot találhatunk (KAHRU et al. 2009). A szemcseméret csökkenésével jelentős változást mutatnak még a katalitikus aktivitás, olvadáspont és az optikai sajátosságok is. A nanoszemcsék esetében egységes olvadás-, ill. forráspont nem adható meg a kémiai heterogenitás miatt (PÁNDICS 2008).

LOCKMAN et al. (2003) és OBERDÖRSTER (2004) leírták, hogy a nanorészecskék képesek átjutni a legerősebb biológiai membránokon is, mint például a vér-agy gáton is, és ezen keresztül a központi idegrendszerbe is bekerülhetnek. A véráramba kerülve a legfontosabb szervek mellett a sejtekbe is bejuthatnak, és jelentős sejtkárosodást okozhatnak. A nanoméretű részecskék expozíciója és transzlokációja is eltérhet ugyanazon anyag nagyszemcsés formájától (SZALAY 2009). Az egészségre gyakorolt hatásoknál fontos szerepet játszik az expozíció mértékének meghatározása, az akut és krónikus toxicitás vizsgálata és az irritabilitás, karcinogenitás megítélése. Az egyik legfontosabb toxikus hatás lehet a nanoanyagoknál az érrendszerben az oxidatív stressz. Emellett számos nanoszemcsés anyagnál, főleg a fém-oxidok esetében, mutatták ki a reaktív oxigén gyökök fokozott termelődését (PÁNDICS 2008). A nanoanyagok karcinogén hatását több tanulmányban is vizsgálták az utóbbi években. ROLLER (2009) szintetikus nanorészecskék hatását vizsgálta patkányokon. Kísérletei során a tesztállatoknál tüdőrákot diagnosztizált. Más kísérletek is hasonló eredménnyel jártak. KUMAR & DHAWAN (2013) áttekintő tanulmányukban összegyűjtötték a mesterséges nanorészecskék genotoxikus, citotoxikus és karcinogén hatásait vizsgáló kísérletek eredményeit és értékelték ezeket. Véleményük szerint az ember is ki van téve a nanorészecskék káros hatásainak, mindenképp elengedhetetlen a további vizsgálati módszerek és a kockázat elemzés fejlesztése a témában.

2.1.3. Felhasználásuk

A nanoanyagok manapság gyakorlatilag mindenhol megjelennek. Főbb felhasználási területek a kozmetikai ipar, a gyógyszeripar, az elektronikai és az optikai eszközök gyártása (PÁNDICS 2008). Ezek mellett még a legtöbb naptej és festék tartalmazza őket, egyéb felhasználásuk lehet még az öntisztuló ablak és ruha (KAHRU et al. 2009). Más lehetséges alkalmazási terület lehet a környezetvédelem. Használhatják a nanoszerkezeteket a káros molekulák megkötésére és környezeti detektorokban is. Fel lehet használni őket a szennyvíztisztításban, biotechnológiában, diagnosztikában és a rákterápiában is (BÁNHEGYINÉ TÓTH 2008). Fogyasztóvédelmi szempontból aggályos, hogy a nanotechnológia által készült termékeknek nagyrészt nincs különleges ismertető jele, így a vevők nem tudhatják, hogy milyen összetételű terméket vásárolnak.

2.1.4. Nanoanyagok kockázata, kockázatbecslése

A nanotechnológia egyre nagyobb térhódítása indokolja, hogy az így előállított anyagok veszélyességét, környezeti és egészségügyi kockázatát megfelelőképpen kivizsgálják. A nanoanyagok könnyebben bejutnak a szervezetbe, belégzés, orális vagy dermális felvétel során. Szétterjedhetnek és kiülepedhetnek a légző rendszer egész területén, átléphetnek a sejthártyákon. Biológiai aktivitásuk nagyobb, így gyulladáskeltő hatásuk is lehet (ZSENI 2010). A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal 2009-ben azt nyilatkozta, hogy sem Magyarországon, sem az Európa Unióban nincsenek nanotechnológiával gyártott élelmiszerek forgalomban. 2009-ben és 2011-ben is kiadott az EFSA (European Food Safety Authority) egy-egy közleményt, amelyekben közlik a tudományos véleményeket a nanotechnológia és az élelmiszerbiztonság kapcsolatáról. A 2011-es már kitér a nanotechnológiával gyártott élelmiszer adalékok és csomagolások kezelésére is (HTTP 2.).

A nanoanyagok tekintetében eseti alapon kell a kockázatértékelést elvégezni, emellett fontos a fogyasztók tájékoztatása, a nanoanyagok címkézése, validált és a nanoanyagok vizsgálatára alkalmas módszerek kifejlesztése, a kockázatokkal kapcsolatos információk összegyűjtése (EURÓPAI BIZOTTSÁG 2012).

A nanoszemcsés anyagok megjelenése mellett új fogalom született: a nanoszemét, nanohulladék. Ez a kategória jelenleg jogilag szabályozatlan és alig tudunk róla valamit. A nanohulladék kezelésről, ártalmatlanításról semmiféle elképzelés nem született eddig.

Németországban dolgoztak ki kutatási tervet arra vonatkozóan, hogy megismerjék és mérni tudják a nanorészecskék szabaddá válását a használt levegőben, szennyvízben, hulladékban vagy akár szállítás közben, feldolgozási folyamat során (ZIMLER 2008).

A nanoszemcsék egészségre illetve környezetre gyakorolt hatását legpontosabban a kvantitatív kockázati számításokkal, mutatókkal írhatjuk le. A számítógépes becslésekkel vigyázni kell, mert nem vehetük figyelembe a megváltozott méretbeli és fajlagos felszínbeli különbséget és így sok esetben azonos eredmény jöhet ki a nano és a nagyszemcsés anyagokra vonatkozóan. Anyagonként meg kell határozni a PEC (Predicted Environmental Concentration) / PNEC (Predicted No-effect Concentration) arányt és rendszeresen felül kell vizsgálni. A számítások végső célja a nanoszemcsékre vonatkozó határértékek meghatározása. A hiányos mérési adatok miatt pontos kockázatbecslési számítások egyelőre nem végezhetőek el (PÁNDICS 2008).

2.2. Cink-oxid és nano cink-oxid

A cink-oxid (ZnO) finom eloszlású fehér por, természetben előforduló formája a cinkit. A ZnO-nak wurtzit rácsszerkezete van és ismert, mint a sárgaréz gyártás mellékterméke. Felhevítve a színe sárgává változik, mivel a rácsból oxigén atomok lépnek ki és egy nem sztöchiometrikus fázis keletkezik. A fölösen beépített cinkatomok rácshibaként jelentkeznek és látható fény energiával gerjeszthetővé válnak, így változatos színű cink-oxid állítható elő (KUNNÉ PÁL 2009). A fém oxidok közül a cink-oxid vízdékonysága igen jó (PÁNDICS 2008).

A cink-oxid jó vezetőképessége, fotovoltai és szorpciós tulajdonságai miatt ipari érdeklődésre tehet szert. Kémiai membránként is használható (NAGYNÉ NASZÁLY 2008). Az egyik legfontosabb ipari felhasználása a gumigyártásban van, itt a vulkanizálási időt csökkentik vele. Ezen felül alkalmazzák a műanyagiparban töltőanyagként, kozmetikában púdereket, arcfestékek alapanyagaként, a gyógyszeriparban segédanyagként, illetve a jó fedőképessége miatt a festékiparban festékek előállításához. Továbbá előállítanak a segítségével metilalkoholt és rendkívül jó optikai tulajdonságainak köszönhetően használják napelemekben, gáz szenzorként és ledekben (KUNNÉ PÁL 2009). A ZnO nehezebben szívódik fel a szervezetben, mindössze a bekerült anyag 3-4 %-a, míg a cink-szulfát (ZnSO_4) vagy a cink-klorid (ZnCl_2) esetében a felszívódás mértéke a 80 %-ot is elérheti. A cink-szulfátból és a cink-kloridból 120 mg/kg a maximális mennyiség, amit az állati takarmány tartalmazhat, a ZnO-nál pedig 2000-2500 mg/kg.

A cink-oxid nanostruktúrát sokféleképpen alkalmazzák sokoldalúsága és kompatibilitása miatt. Szintetizálhatják nanorúd, nanodrót, nanocső, nanoöv, nanogyűrű és nanopropeller formában

is. A magas érdeklődés a nano ZnO iránt a lehetséges alkalmazásból ered az elektronikában, a szerkezeti felépítésekénél és a biológiai anyagoknál (KUCHIBHATLA et al. 2006). Ezeken felül még használhatják környezeti kármentesítésre, termékek adalékanyagaiként, élelmiszerekben (Zn tápanyagforrás), kozmetikai szerekben és naptejekben a kiváló UV abszorpciós és reflexiós tulajdonságai miatt (HONGBO et al. 2013). A kozmetikában felhasznált nanorészecskék hatására a termékeknek jobb textúrája, élénkebb színe lett és a hatóanyag bőrbe való bejutása is könnyebbé vált. A naptejekben található nanorészecskék potenciális toxicitása a méretükből és elsősorban a szabad gyökképződésből ered, valamint abból a képességből, hogy az immunológiai védekező mechanizmusokat el tudják kerülni, illetve komplexeket tudnak képezni a fehérjékkel. (NEWMAN 2009).

A nanoanyagok széleskörű és bővülő előállításnak és használatának köszönhetően egyre nő a környezetbe jutás lehetősége, és ezáltal veszélyt jelenthet a talajszervezetekre (WAALEWIJN-KOOL et al. 2013). A fémoxid nanoszerkezetek toxicitása legalább három különböző mechanizmusra osztható (BRUNNER et al. 2006). Először is a részecskék a környezettel reagálva toxikus összetevőket engedhetnek a közegbe, például a cink-iont a ZnO-ból. Másrészt a részecskén lezajló felületi kölcsönhatások előidézhetik olyan toxikus összetevők keletkezését, mint például a kémiai gyökök, illetve a szabad oxigén gyökök. Harmadszor a részecskék vagy a felületük közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a szervezettel, és meg is zavarhatják annak működését, például olyan módon, ahogy a szén nanorészecskék kölcsönhatásba léphetnek a membránokkal, illetve a DNS szálba is interkalálódhatnak. Ez a három folyamat a nano ZnO-ra is igaz. A kioldódott Zn^{2+} ion bizonyítottan hozzájárul ezeknek a nanorészecskéknek a citotoxicitásához (HONGBO et al. 2013). A közeg pH-ja is fontos szerepet játszik a cink-ionok kioldódásában (WAALEWIJN-KOOL et al. 2013). A cink-ionok kioldódásával magyarázható, hogy a fémoxidok közül a nano ZnO a legtoxikusabb. A nano ZnO fotokatalitikus tulajdonsága elősegíti a reaktív oxigén gyökök (ROS) termelődését (HONGBO et al. 2013). A reaktív oxigén gyökökről kimutatták, hogy károsíthatják a lipid sejteket, szénhidrátokat, fehérjéket és a DNS-t is, gyulladásához és oxidatív stresszválaszhoz vezethetnek (KAHRU et al. 2008).

A ZnO és a nano ZnO toxicitását sok kísérletben hasonlították össze. WONG et al. (2009) öt tengeri élőlényen tesztelték a két anyagot. Kísérleteik során a nano ZnO nagyobb aggregátumokat képzett a tengervízben, mint a nagyszemcsés megfelelője, pedig magasabb a vízzoldhatósága: nano ZnO ($3,7 \text{ mg L}^{-1}$), ZnO ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$). A vizsgálataikban a nano ZnO toxikusabbnak bizonyult az alga fajokra, viszont relatíve kevésbé toxikusnak a rák és hal fajokra, mint a nagyszemcsés ZnO. HEINLAAN et al. (2008) és BLINOVA et al. (2010) kísérleteiben mind a nanoméretű, mind a nagyszemcsés erősen toxikus volt, a két anyag hatása között nem volt szignifikáns különbség.

Hasonló eredménye lett XIONG et al. (2011) kísérleteinek zebradánió (*Danio rerio*) halfajon. A nagyszemcsés és nano szuszpenzióknak, és a cink-ion oldatnak hasonló toxikus hatása volt a trópusi eredetű házasított halfajra.

Az Eötvös Lóránd Tudományegyetemen végzett kísérletekben a cink-ion kioldódás nagyjából megegyező a nano és a nem-nano ZnO-nál, a magasabb koncentrációknál a nanoból több oldódott ki. A különböző pH-kon kioldódó cink-ionokról készült diagramot a 1. mellékletben láthatjuk.

2.3. A talaj és a talaj élőlények szerepe

A talaj több fázisból álló, szerves és szervetlen anyagokból felépülő bonyolult rendszer, fontos szerepe van az elemek körforgásában, valamint a szárazföldi ökoszisztémák tápanyagellátásban is. A talajok biológiai és ökotoxikológiai vizsgálata egyre nagyobb jelentőséget kap. Azonban mivel még mindig nem ismertük ki eléggé az ép talaj ökoszisztémáját sem, nehéz megkülönböztetni a klimatikus és szezonális változásokat a szennyező anyagok károsnak minősülő hatásaitól (GRUIZ et al. 2001). A talaj ökotoxikológia vizsgálja a szennyeződések és hatásukat a fontos talajlakó szervezetekre (SOCHOVÁ et al. 2005). Érdemes megemlíteni az adaptációs képességet is, leginkább a talaj mikroflórája képes hozzászokni, ellenállni a káros hatásoknak. A talaj ökoszisztémáját, biológiai állapotát sokféleképpen vizsgálhatjuk, egységesített módszerek nincsenek. Jellemzésükre használhatunk ökotoxikológiai, biodegradációs és bioakkumulációs teszteket (GRUIZ et al. 2001).

A talajélőlények több szempontból is fontos szerepet játszanak az ökoszisztémák megfelelő működésében. Szabályozzák a tápanyagkörforgalmakat, szerepük van a nedvesség tárolásban és szállításban, a biotikus szabályozásban és a detoxifikációban, befolyásolják a talaj szerkezetét, az atmoszféra összetételt. A talajban található élőlényközösségek igen változatosak, amelyek eltérő biokémiai teljesítőképességű szervezetekből állnak. A legnagyobb frakciót képviselő szervezetek a mikroorganizmusok, a gerinctelen és gerinces állatok tömeg és egyedszáma jóval alacsonyabb, azonban a közösségi anyagcserében betöltött jelentőségük nagy (SZEDER 2011).

2.4. Tesztállatok bemutatása

2.4.1. Fonálférgesek (*Nematoda*)

A nematoda szó görög eredetű és fonalat, szálat jelent. A legelső adatok a fonálféregre több mint 4000 évvel ezelőtről származnak. Abból az időből főképpen az élősködő nematodákról készültek feljegyzések, hisz azokkal volt közvetlenebb kapcsolata az emberiségnek. Az eddig leírt fajok száma 20 000 körül van, ebből körülbelül 800-at jegyeztek fel eddig Magyarországon (ANDRÁSSY & FARKAS 1988). A fonálférgesek általában petékkel szaporodnak (JÁVOR 1974).

A fonálférgeseket két csoportra oszthatjuk: élősködő (*Nematoda parasitica*) és szabadon élő (*Nematoda libera*) fonálférgesekre. A szabadon élő a fonálférges a természetben bárhol előfordulhatnak, illetve valamilyen formában a növényekhez kötöttek, tehát a közelükben élnek vagy belőlük táplálkoznak. Ez a növény számára lehet semleges vagy ártalmas, és az ártalom nem csak közvetlen módon jelentkezhet, mivel a fonálférges vektorként is funkcionálhatnak és így megfertőzhetik a növényt különböző hordozott vírusokkal. A növényeken vagy növényekben élő fonálférgeseket, növényi kártevő fonálférgeseknek, vagy fitonematodáknak hívjuk (ANDRÁSSY & FARKAS 1988). A fitonematodák a szabadon élő fonálférgesekhez tartoznak.

A ma ismert fajoknak nagyjából a fele szabadon él a természetben, ezek között fele-fele arányban találhatók vízben és szárazföldön élő fajok. A lényeges szempont számukra a talaj víztartalma, már a talajszemcsék közötti kapilláris hézagokban összegyűlt víz is elegendő nekik, viszont porszáraz talajban nem életképesek (ANDRÁSSY & FARKAS 1988). FRECKMAN et al. (1975) kísérletei alapján elmondhatjuk, hogy még a sivatagi talajban is képesek megélni a fonálférgesek.

A fonálférgesek extrém mélységekben is megtalálhatóak, dél-afrikai bányákban 0,9 -3,6 km mélységben elhelyezkedő földalatti vízkészletekből vett mintákban is sikerült kimutatni baktériumevő nematodákat. Ezek az eddigi legmélyebben megtalált, a hőséget és az óriási nyomást is elviselő többsejtű élőlények (BORGOINE et al. 2011).

A fonálférgesek négyszeri vedléssel érik el az ivarérettségüket, miközben állandóan táplálkoznak és nőnek (JÁVOR 1974).

A szabadon élő nematodák alapvetően négy táplálkozási formát mutatnak, amihez szájszervük és életmódjuk is alakult: baktériumevők, alga- és törmelékevők, növényi nedvszívók és ragadozók (ANDRÁSSY & FARKAS 1988).

A fonálférgek legnagyobb tömegben a talajban élnek, porhanyítják a földet, ezáltal fokozzák a víztároló képességét, ugyanakkor szellőztetik is. Aprítják az elhalt növényi és állati maradványokat, részt vesznek a humuszképződésben is. Elpusztult tetemeik természetes trágyaként járulnak hozzá a talaj tápanyagforgalmához. A talajhoz hasonlóan az édesvizek és a tengerek életében is fontos szerepet játszanak. Más élőlényekkel szoros kölcsönhatásban vannak mindenütt, akár az életfeltételeiket is megteremthetik (ANDRÁSSY & FARKAS 1988).

Több mint három évtizede használják a fonálférgeket laboratóriumi tesztekben. Különböző fajokat vontak be a vizsgálatokba a toxicitás kimutatására, vízben, táptalajokon és földben tesztelve. Nagyrészt szabadon élő, baktériummal táplálkozó fajokat használnak tesztállatként. Az ökotoxikológiai és genetikai vizsgálatokban főképp a *Panagrellus* fajok (1. kép) és a *Caenorhabditis elegans* az elterjedt modellállatok (HÖSS & WILLIAMS 2009). A bakterivorok csoportja meglehetősen fajgazdag, ugyanakkor nagyfokú egyöntetűség jellemzi őket. Legjellegzetesebb képviselőik a *Secernentia* osztály egyik nagy rendjét alkotó Rhabditidák, azon belül pedig a *Cephalobina* és a *Rhabditina* alrend tagjai. Egyszerű, kevésbé módosult szájjüreggel rendelkeznek. A táplálék felvétele egyszerű beszívással történik. Szaprobionták, kedvelik a bomló anyagokban gazdag közegeket, ahol a táplálékul szolgáló baktériumok nagy tömegben tenyésznek. A Cephalobinák egy része más élőhelyeken is tenyészik, pl.: a talajban. A baktériumevők napi táplálék igénye igen nagy, ezért amint csökken a baktérium szám a környezetükben (a baktériumok lebontó munkája véget ér), a fonálférgek tenyészete is összeomlik. Életciklusuk rövid, a populáció összeomlása előtti utolsó nemzedék rendszerint már nem fejlődik ivaréretté, hanem pete vagy lárva alakjában lappangó élet mellett várják, hogy az életfeltételek ismét megfelelőek legyenek számukra (ANDRÁSSY & FARKAS 1988).

A nematodákat különböző teszt szubsztrátokban vizsgálják, ez több szempontból is fontos. Egy anyag akkor okozhat toxikus hatásokat egy élőlényen, ha az számára felvehető a környezetből. Ez a felvehetőség egy komplex környezetben, mint az üledék vagy a talaj, függ a kemikáliák összetételétől és a tesztállat mozgási és étkezési viselkedésétől. Az üledékben és a talajban, ahol a fonálférgek találhatóak, az odajutott anyagok nagy része kötődhet a talajszemcsékhez (HÖSS & WILLIAMS 2009). Amikor különböző szubsztrátokban vizsgáljuk a Nematodákat, az anyagok eddig nem ismert tulajdonságaira is fény derülhet, illetve arra is, hogy milyen környezetben toxikusabb egy adott xenobiotikum a tesztállatainkra.

WANG et al. (2009) és KAHRE et al. (2011) kísérleteiben erősen toxikusnak bizonyult a nano ZnO a *C. elegans* fajra. Mindkét vizsgálatnál azt állapították meg, hogy a ZnO részecskékből kioldódó cink-ion játszott szerepet a toxikus hatás kiváltásában.



1. kép: *Panagrellus redivivus* (KISS 2014)

2.4.2. Ugróvillások (*Collembola*)

Az ugróvillások (*Collembola*) a hatlábúak (*Hexapoda*) egy ősi csoportja. A mezofaunába tartoznak, világszerte elterjedt állatok, csak a tengerek és óceánok nyíltvízi területein nem találhatók meg. Élhetnek a talaj felszínén, a talajban, a korhadó avarban, a fák kérge alatt és magukon a növényeken is. Az utóbbi ugyanúgy jellemző mind a szárazföldi, mind a vízinövényekre is (DÁNYI & TRASER 2008). Több mint hatezer fajuk ismert a világon (SZEDER 2011). Magyarországon jelenleg 410 ugróvillás faj ismert.

Fontos szerepet töltenek be a talaj-ökoszisztémában, jelentős lebontó szervezetek. Különböző táplálkozású ugróvillás fajokat ismerünk, ezek között lehetnek ragadozók is. Általában széles táplálkozási spektrummal rendelkeznek, fogyaszthatnak gomba spórát, hifát, zuzmókat, mohákat, növényi maradványokat, baktériumokat, algasejteket és fonálférgeket is (SERES 2009).

Az ugróvillások rendkívül fontos, központi szerepet játszanak a talaj szerkezetének kialakulásában, a növényi maradványok, gombák fogyasztásával, aprító tevékenységükkel, illetve ürülékük, mint mikroszkopikus szerves struktúrák, megnövelik az anyagok hozzáférhetőségét a baktériumok számára (SZEDER 2011). Emellett fontos szerepük van a mikorrhiza gombák terjesztésében (SERES & BAKONYI 2002, SERES et al. 2003) és hatalmas jelentőségűek, mint a talajfauna ragadozóinak táplálékbazisa (DÁNYI & TRASER 2008). A remediációs folyamatokban is részt vesznek, és érzékenyek a talajszennyezés hatásaira (WAALEWIJN-KOOL et al. 2013).

Az ugróvillások ivarérettség után egész életük során vedlenek, akár negyven alkalommal is. Eközben morfológiai változásokon mennek keresztül, egyre sötétebb és kontrasztosabb színük lesz. A környezeti tényezők is eredményezhetnek morfológiai változásokat az ugróvillásoknál, ez jócskán megnehezítheti a faji felismerésüket (DÁNYI & TRASER 2008).

A szabvány szerinti ökotoxikológiai tesztelésnél használják a *Folsomia candida* fajt (2. kép). Apró, fehér állatok, hasi oldalukon ugróvillával, amit ha hátracsapnak, felpattannak a levegőbe. Leginkább erdei talajban élnek, hasi tömlővel lélegeznek, ami miatt a talajgőzökre érzékenyek. Epimorfózissal (kifejléssel) szaporodnak, alacsony nedvesség tartalomnál a peték kiszáradhatnak. Megfelelő nedvességtartalmú, 20 °C-os környezetben 10-15 nap alatt kelnek ki, majd további 10-15 nap alatt válnak ivaréretté (GRUIZ et al. 2001).



2. kép: *Folsomia candida* (KISS 2014)

2.5. Ökotoxikológiai vizsgálatok talajállatokkal

2.5.1. Vizsgálatok *Folsomia candida* ugróvillással

Az ugróvillásokat körülbelül négy évtizede használják ökotoxikológiai tesztelésnél (KROGH 2008). A *Collembolák* széles körben elterjedtek, laboratóriumi körülmények között könnyen tarthatóak és szaporíthatóak, szobahőmérsékleten rövid a generációs idejük (BODROG 2012). Az OECD 232-es guideline-ja ugróvillások tesztelését írja le talaj közegben. Két fajra vonatkozik a leírás, *Folsomia fimetaria* és *F. candida* ugróvillás fajokat lehet használni a szabvány által leírt tesztben. A szabvány leírja, hogy mennyi ideig tart a teszt, milyen ismétlés számot és koncentráció sorozatot érdemes használni, milyen korú egyedek szükségesek, hány egyedet kell felhasználni, és hogy milyen statisztika eljárásokat jó alkalmazni a teszt kiértékelésére. Külön kitér a felhasznált talaj összetételére (5% tőzeg, 20% kaolin, 74% homok, 1% kalcium-karbonát) és mennyiségére. A teszt érvényességének feltételei is meghatározottak (kontroll Petri-csészékre vonatkozóan, a teszt végén):

- adult mortalitás átlaga nem lépheti túl a 20%-ot;

- juvenilis egyedek számának átlaga legalább 100 db;
- a juvenilisok számának variációs koefficiense 30%-nál kevesebb kell, hogy legyen.

A variációs koefficiens (CV) képlete:

S: szórás

X: átlag

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Egy másik teszt szabvány az ISO 11267:1999, ez régebbi, mint az OECD által kiadott és a vizsgálatomban sem ezt vagy ennek a változatait használtam.

2.5.2. Vizsgálatok fonálférgekkel

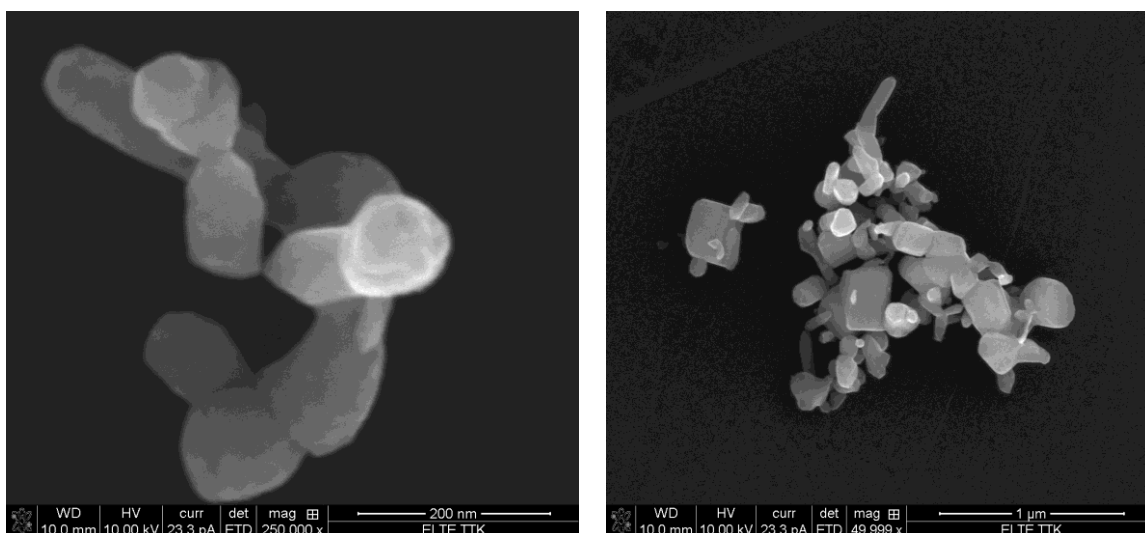
A fonálférgek megfelelő tesztállatnak bizonyultak különböző anyagok vizsgálatánál, mivel kis helyet igényelnek, rövid az élettartamuk, egyszerű a reprodukciójuk és könnyen fenntarthatóak laboratóriumi körülmények között (BOYD et al. 2001). Mostanában több standardizált módszer is született a szennyvíz, az üledék és a talaj tesztelésére Nematodák felhasználásával. Több mint húsz ISO, OECD és ASTM tesztszabványt használhatunk a fonálférgek tesztelésre. Általában több paramétert is vizsgálnak: mortalitást, növekedést, reprodukciót és a viselkedésüket a tesztanyag hatására. A klasszikus toxicitás vizsgálat mellett a *C. elegans*-t biokoncentrációs vizsgálatokra is felhasználják. A rövid generációs idő és a laboratóriumi körülmények közötti könnyű tenyésztés miatt, megfelelő tesztállatnak bizonyulnak gyors és alacsony költségű tesztek elvégzéséhez. Emellett magas az érzékenységük a különböző szennyezőanyagokra és rövidebb idő alatt reagálnak rájuk (HÖSS & WILLIAMS 2009).

Amint az ökotoxikológiai tesztek egyre inkább teret hódítanak, egyre nagyobb jelentősége lesz a fonálférgeknek is a laboratóriumi tesztelésben. A Nematodák ideális tesztállatnak bizonyulnak a toxikus hatások vizsgálatára a géntől a közösségeig, ami egy újabb kihívás lesz a jövőben a tudós társadalomnak (HÖSS & WILLIAMS 2009).

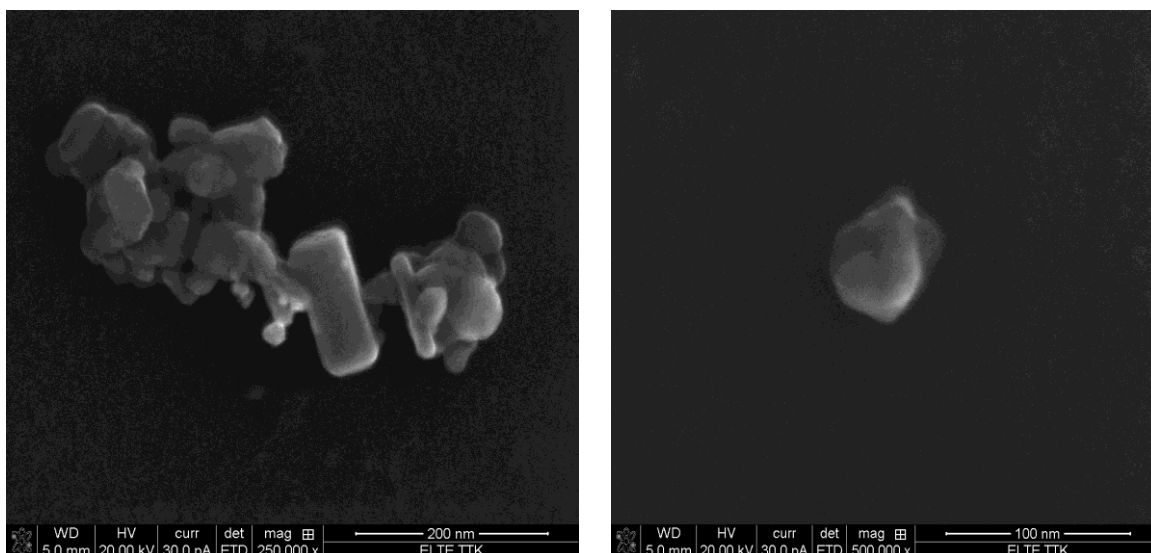
3. Anyag és módszer

3.1. Felhasznált anyagok

A tesztek során négy anyagot teszteltem két tesztszervezeten. A Sigma-Aldrich cég nagyszemcsés ZnO-ját és ugyan ennek a cégnek a gyártó adatai alapján 50 nm-nél kisebb részecskéket tartalmazó ZnO-ját hasonlítottam össze egy-egy tesztben. Sávolý Zoltán megvizsgálta nano és bulk ZnO szemcseméret eloszlását pásztázó elektronmikroszkóp segítségével (3-6. kép). A vizsgálat eredményei jelentősen eltértek a gyártó által megadott szemcsemérettől. Az eloszlási görbén nagyjából két csúcs figyelhető meg. Az anyag egy része 100-200 nm közötti, míg a második csúcs 300-500 nm közötti, tehát a Sigma-Aldrich cég "nano" ZnO-ja már nagyszemcsésnek minősül.

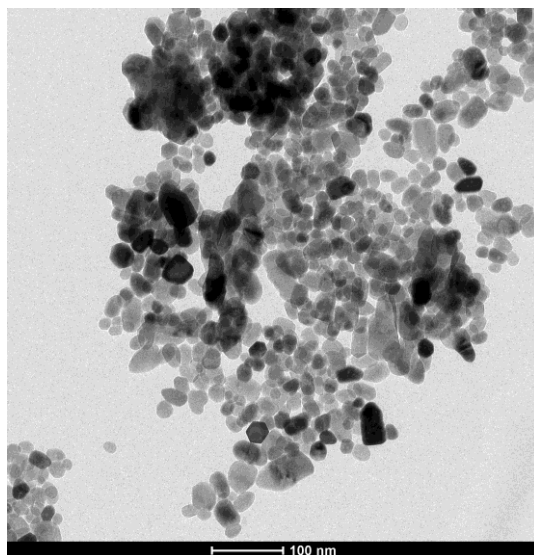
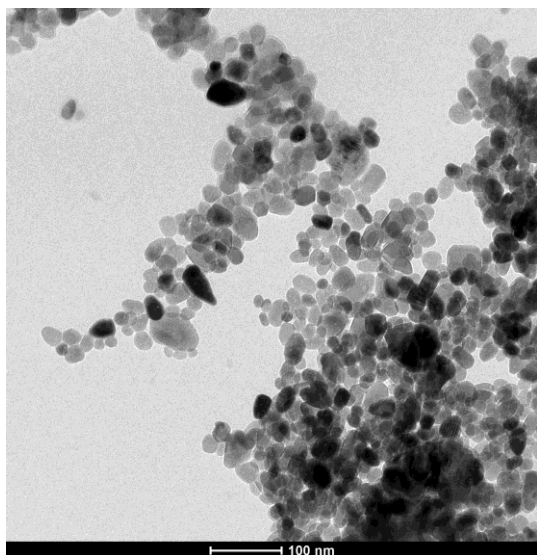


3-4. kép: Sigma-Aldrich bulk ZnO (SÁVOLY 2013)

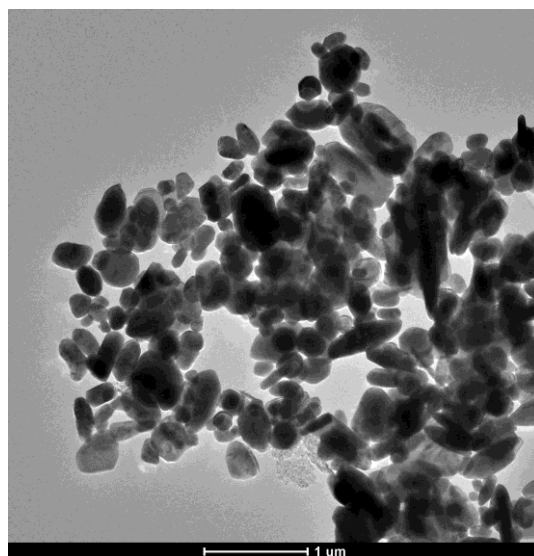
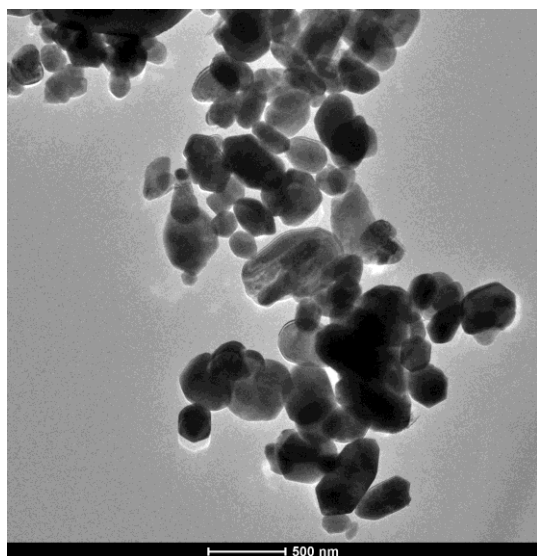


5-6. kép: Sigma-Aldrich 50> nano ZnO (SÁVOLY 2013)

Mivel a Sigma-Aldrich cég nanokészítménye Sávolý Zoltán vizsgálatai alapján nagyszemcsésnek bizonyult, ezért két (20 nm és 100 nm), a Szegedi Tudomány Egyetem által készített, elektronmikroszkóppal bevizsgált szemcseméretű anyagot is teszteltünk. A nanorészecskéket hidrodermális úton állították elő. Az anyagoknál felületkezelés nem történt. A szintézis után a mintát megmosták, centrifugával elválasztották majd szárították, a karakterizálás ezután történt. A szemcseméret eloszlást transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) és röntgendiffrakcióval (XRD) vizsgálták. A röntgendiffrakciónál a 0,05-0,25 nm hullámhossztartományba eső röntgensugarak szóródását vizsgálják. A mérést sugárzásdetektorok segítségével végzik és intenzitásmérésen alapul, a vizsgált anyag egészének szerkezetéről nyújt képet. A szemcseméret eloszlási grafikonok az 2. mellékletben találhatóak. A transzmissziós elektronmikroszkóppal készült képeket pedig alább láthatjuk (7-10. kép).



7-8. kép: 20 nm ZnO (Szegedi Tudomány Egyetem felvételei 2013)



9-10. kép: 100 nm ZnO (Szegedi Tudomány Egyetem felvételei 2013)

3.2. *Folsomia candida* tesztfajjal végzett tesztek

3.2.1. Előkísérletek

FOUNTAIN & HOPKIN (2001) leírása alapján először az OECD 232 teszt módosított változatát csináltuk meg. A módosítás abban rejlik, hogy aktív szén nélküli gipszre raktuk a teszt állatokat és Eppendorf cső kupakjába helyeztük ki az élesztőbe kevert tesztanyagot. A gipszbe szén azért nem tettünk, hogy az állatok mindenképp az élesztőből fogyasszanak. *Folsomia candida* (Willem 1902) ugróvillás faj kifejlett egyedeit használtuk teszt állatként. Az OECD szabványban leírtak szerint 10-10 db *F. candida*-t raktunk minden műanyag Petri-csészébe (11. kép). A gipszöntést is én végeztem, 200 g gipsz/ 200 g víz aránnyal. Az állatok az általam készített szinkron tenyészetből származtak és 9-12 naposak voltak. A teszt időtartama 28 nap volt. A szegedi egyetem által előállított nZnO-t vizsgáltuk két szemcseméretben (20 nm, 100 nm), öt koncentrációban (400 mg/kg, 800 mg/kg, 1600 mg/kg, 3200 mg/kg, 6400 mg/kg), koncentrációnként 4-4 ismétléssel és 8 db kontroll csoporttal. Az Eppendorf kupakokba 0,05 g élesztőt és 20 µg oldatot helyeztünk (12. kép). Az oldatokat ultrahangos rázatás (20-25 min, 75 %-on) után pipettáztuk az élesztőhöz. Az ultrahangos szonikálást használják a nanoszuszpenzió stabilizására, aggregáció megakadályozására, de emellett megnövelheti a biológiai elérhetőségét is az anyagnak. A szonikálás alatt ionok oldódhatnak ki a nanoanyagból (MANUSADŽIANAS 2009). A teszt végén az adult egyedek mortalitását és a szaporulat mennyiségét értékeltük ki az OECD szabvány alapján.

A második és a harmadik teszt táplálékpreferencia vizsgálat volt. Először *Sinella coeca* tesztállatot használtunk, majd *Folsomia candida* tesztállatot. Egy koncentrációban (6400 mg/kg) a Sigma-Aldrich cég által gyártott <50 nm-es nZnO oldatot vizsgáltuk. A kísérletet kisméretű Petri-csészékben végeztük, szűrőpapíron. A szűrőpapír fölé egy előre nyomtatott papírt helyeztünk, amin ki volt jelölve két helyen az élesztő helye és körülötte egy-egy körben a vizsgálandó terület, ahol az ürülékszemcséket számolni kellett. Maga a vizsgálat azon alapszik, hogy a *Collembola*-k oda ürítenek, ahol esznek és így kideríthető, melyik táplálékot preferálják. A Petri-csészékbe 2-szer 0,025 g élesztőt tettünk, az egyik mindig a kontroll volt, arra 10 µg Milli-Q vizet pipettáztunk. A másik adag élesztőre 10 µg oldatot raktunk.

Az OECD 232 teszt módosított változatából még két tesztet végeztünk. A táplálékpreferencia vizsgálatból kiderült, hogy érdemes a Sigma-Aldrich cég által gyártott nano ZnO-t is vizsgálni ilyen tesztben, ezért az egyik kísérletnél vizsgáltunk egy nagyszemcsés kontrollt,

az előbb említett Sigma-Aldrich nano ZnO-t és a szegedi egyetem által gyártott 20 nm szemcseméretű nZnO-t, a másik tesztnél már csak a nagyszemcsés ZnO-t és a Sigma-Aldrich nZnO hatását hasonlítottuk össze. Célunk az volt, hogy ugyanazokat az anyagokat leteszteljük talajon és gipszen egyaránt, ugyanazokban a koncentrációkban, ugyanolyan laboratóriumi körülmények között. Ez sajnos nem sikerült a gipszes tesztek sikertelensége miatt.



11-12. kép: Az OECD módosított változatához használt Petri-csészék és az Eppendorf kupakokba helyezett élesztők (KISS 2014)

3.2.2. Főkísérlet

Az előtesztek tapasztalatai alapján terveztük meg a főtesztet. Az Eredmények c. fejezetben láthatjuk, hogy az aktív szén nélküli gipszen történt tesztek nem hoztak értékelhető eredményt. Az OECD szabványban megadott feltételeknek egyik sem felelt meg, de szemléltetésnek így is használhatóak. Mivel a szegedi 20 nm-es és 100 nm ZnO mennyisége korlátozott volt, ezeket az anyagokat talajon nem tudtuk tesztelni, így a végső kísérletekben a Sigma-Aldrich cég által gyártott nZnO és a nagyszemcse méretű ZnO-t hasonlítottuk össze. A teszt végrehajtását, hasonlóan az előtesztekhez, az OECD 232 szabvány alapján végeztük, csak itt a szabványban meghatározott összetételű talajba helyeztük a kísérleti anyagot és az állatokat is. Edényenként 26 g talajt mértünk ki. A hozzáadott desztillált vízben oldott kísérleti anyag mennyiségét a talaj kívánt víztartalma alapján számoltuk ki. Így ehhez a talajmennyiséghez 6 g desztillált vizet adtunk a kontroll edények esetében és 6 g desztillált vízben elkevert fém-oxidot a kezelt edények esetében. A koncentrációk ugyanazok voltak, mint az előkísérletekben, kivéve, hogy a 6400 mg/kg-os legmagasabb koncentrációt itt elhagytuk. Az oldatokat használat előtt itt is 20 percig ráztuk ultrahangon. Az állatokat egy csipetnyi élesztővel etettük. A három hét lejárta után a leolvasásnál vízzel töltöttük

meg az edényeket, majd tintával színeztük be, hogy jól láthatóak legyenek az állatok. Ezek után leszámoltuk az adult mortalitást és a szaporulatot.

3.3. *Panagrellus redivivus* tesztfajjal végzett teszt

Akut mortalitási teszteket végeztünk, a tesztorganizmus egy szabadon élő, bakterivor táplálkozású fonálféreg faj, a *Panagrellus redivivus* (Linné 1767) volt (13-14. kép). Kifejlett nőtény egyedekkel dolgoztunk. A törzstenyészetet laboratóriumban, zabpelyhes táptalajon, sötétben, $20 \pm 1^\circ\text{C}$ tartjuk. A teszt során 24 óra volt az expozíciós idő, ezért a teszt viszonylag gyorsan elvégezhető és kiértékelhető. A teszt végpontja a mortalitás, a tesztek leolvasását mikroszkóp alatt végezzük. Mivel a teszt nem szabványosított ökotoxikológiai teszt, az érvényességét úgy határoztuk meg, hogy a kontroll csoportban a maximális elhullás nem lehet több 20 %-nál. Ennél a kísérletnél Sigma-Aldrich cég által gyártott nZnO, és a nagyszemcse méretű ZnO-t használtuk. A koncentrációkat az előkísérletek alapján állítottuk be. Így nem a *F. candida* fajnál használt koncentrációkat alkalmaztuk, hisz azok túl magas értékek lettek volna. Öt koncentrációt készítettünk: 50 mg/l, 25 mg/l, 12,5 mg/l, 6,25 mg/l és 3,15 mg/l. Minden koncentrációt nyolc ismétlésben állítottunk be. Az elkészült szuszpenziókat 20 percig ultrahangos szonikátorba helyeztük. A teszteket 96 lyukú mikrotitráló lemezekben végeztük, ismétlésenként 5 kifejlett nőtényt használtunk. A mikro-plate-t termosztátba helyeztük $20 \pm 1^\circ\text{C}$ hőmérsékletre és 24 óra után megszámloltuk a mozgásképtelen és az elhullott egyedeket. A mellékelt képen a kísérlet beállításánál behelyezett fonálférgeket láthatjuk.



13. kép: *Panagrellus redivivus* a zabpelyhes táptalajról levéve (KISS 2014)



14. kép: *Panagrellus redivivus* a mikro-plate-ben (KISS 2014)

3.4. Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisnél az R programot használtuk. Az R-program széles skálájú statisztikai és grafikai technikákat nyújt (R CORE TEAM 2013). Az R-program segítségével, az összes kísérletnél, ANOVA és post hoc tesztként, Dunnett tesztet végeztünk.

Az ANOVA számos, egyező szórású, normál eloszlású csoport átlagának összevetésére alkalmas statisztikai módszer. Az egyszempontos varianciaanalízis a kétmintás t-próba általánosított változata, mely kettőnél több független csoport esetén képes egy változó átlagának összehasonlítására.

A Dunnett teszt a kontroll csoporthoz viszonyítva számolja ki, minden egyes változóra, a Student féle t-próbát (R CORE TEAM 2013).

4. Eredmények

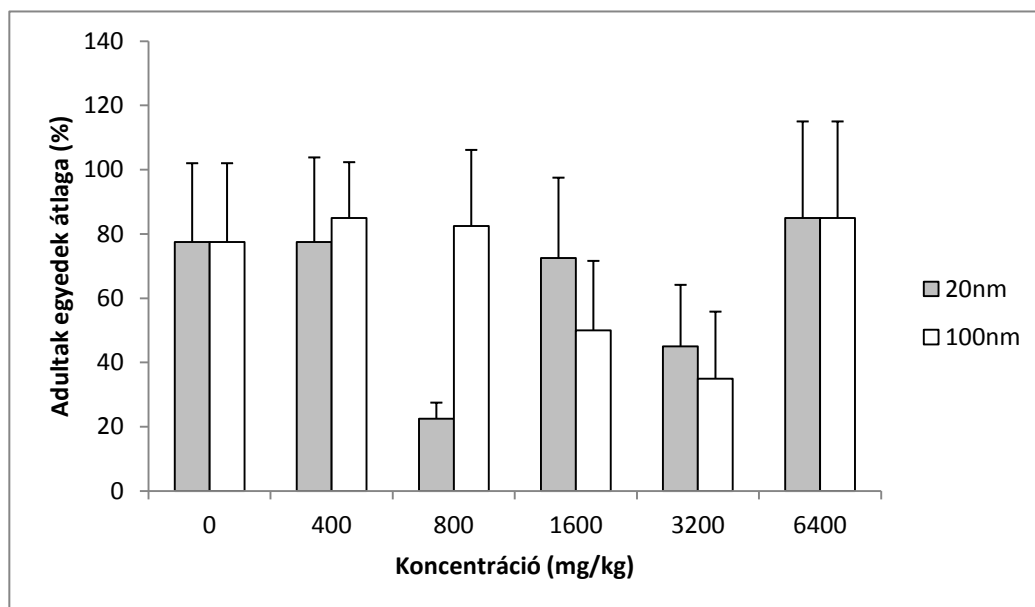
4.1. *Folsomia candida* fajjal végzett kísérletek eredményei

4.1.1. Előkísérletek

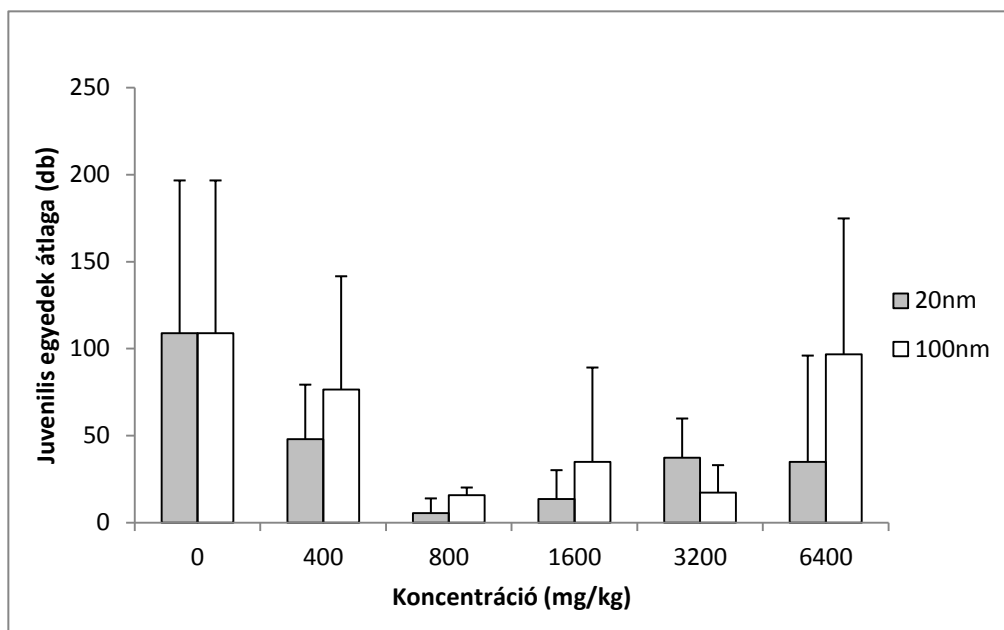
A gipszen végzett tesztek nem feleltek meg az OECD 232-es szabványban leírt feltételeknek. A teszteknek ezen felül sem lett értékelhető eredménye, koncentrációfüggőséget sem tapasztaltunk, amit viszont a talajon végzett tesztnél igen. A két fajjal végzett (*Sinella coeca*, *Folsomia candida*) táplálékpreferencia vizsgálatnál 100 % mortalitást tapasztaltunk. Valószínűleg a kis Petri-csészékben a 6400 mg/kg-os koncentráció letálisnak bizonyult.

Az alábbiakban láthatjuk az előtesztek eredményeit diagramokon. Az előtesztekhez végzett Dunnett próbák eredményeit a 3. mellékletben tekinthetjük meg.

Az első, gipszen végzett teszt során, a Szegedi Tudomány Egyetem által készített 20 nm és 100 nm ZnO-t hasonlítottuk össze (1-2. diagram). Az adult egyedek mortalitásában nem látható koncentrációfüggőség. A juvenilis egyedek száma a kontroll csoporthoz képest jól láthatóan csökkent. A két szemcseméret hatása között nincsen szignifikáns különbség.

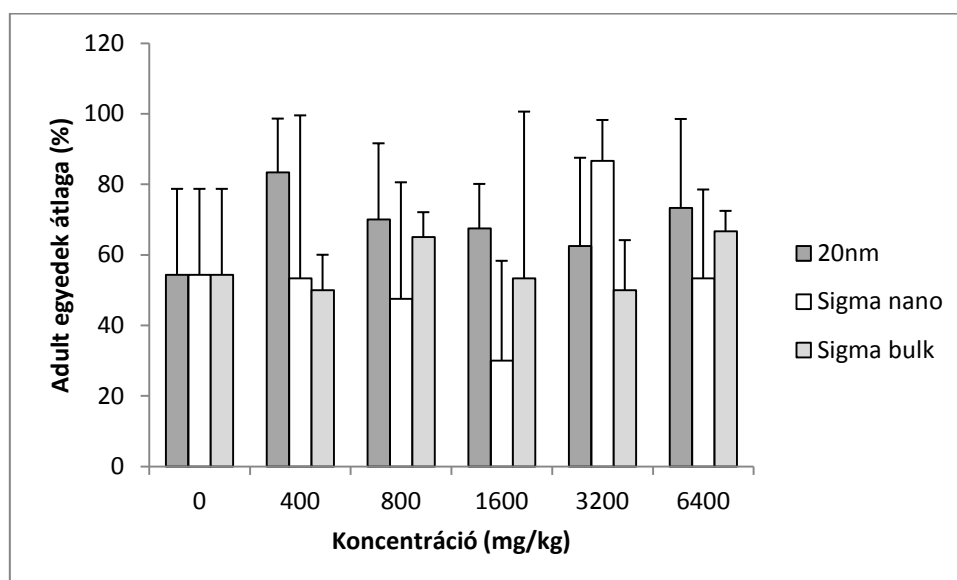


1. diagram: Az első, gipszen végzett kísérletben túlélő adult egyedek átlaga és szórása százalékban

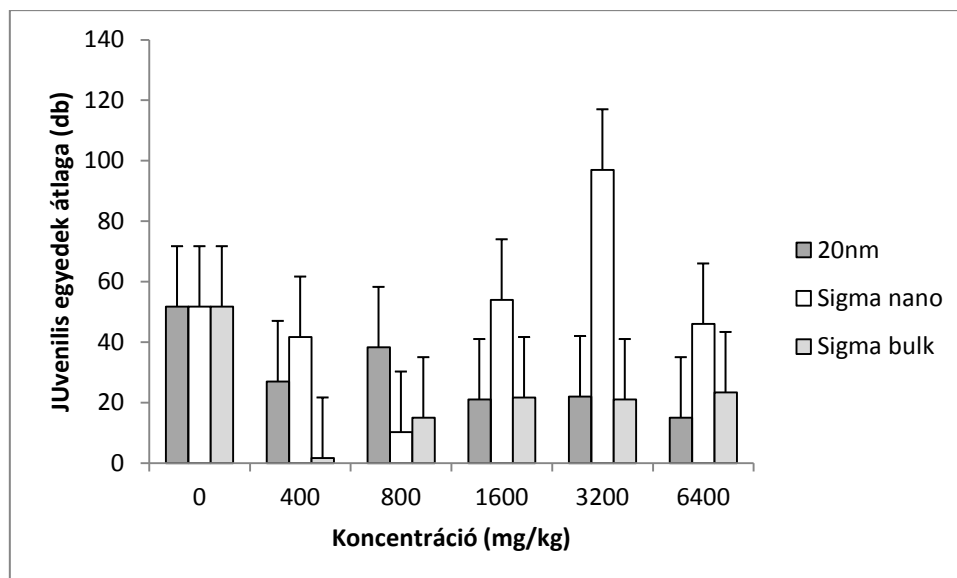


2. diagram: Az első, gipszen végzett kísérletben született juvenilis egyedek átlaga és szórása

A második, gipszen végzett teszt során, a Szegedi Tudomány Egyetem által készített 20 nm és a Sigma-Aldrich cég nagy szemcseméretű (bulk) és 50 nm-nél kisebb szemcséket tartalmazó nano ZnO-t hasonlítottuk össze (3-4. diagram). Az adult egyedeknél nem tapasztaltunk mérhető toxikus hatást a kontroll csoporthoz képest. A juveniliseknél sem látható olyan mértékű csökkenés, mint az előző kísérletnél.

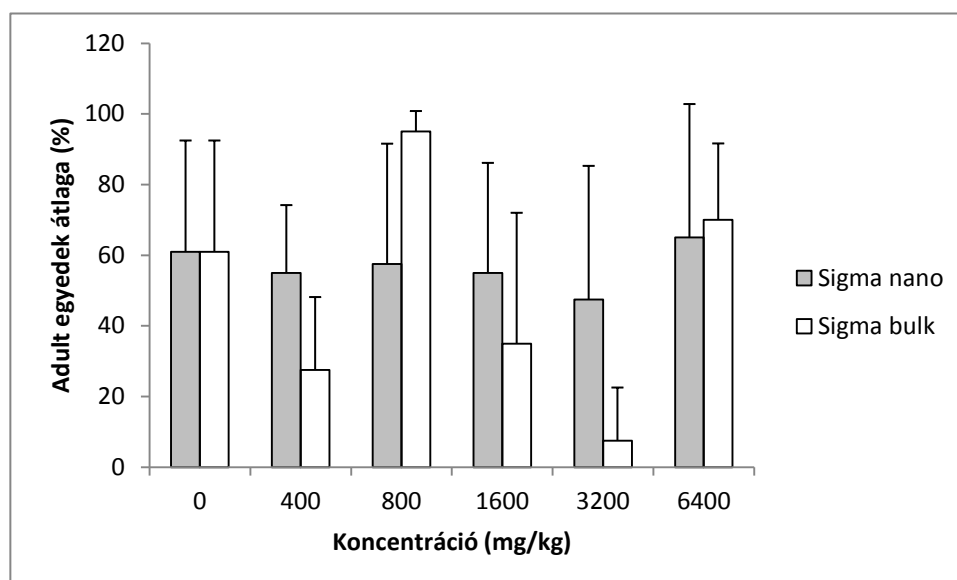


3. diagram: A második, gipszen végzett kísérletben túlélő adult egyedek átlaga és szórása

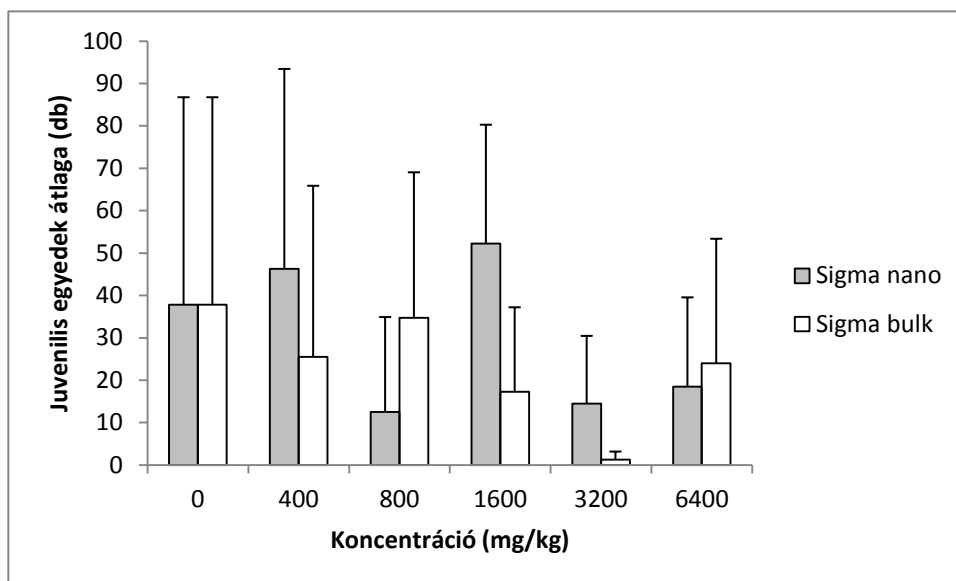


4. diagram: A második, gipszen végzett kísérletben született juvenilis egyedek átlaga és szórása

A harmadik, gipszen végzett teszt során a Sigma-Aldrich cég által gyártott nagy szemcseméretű (bulk) és 50 nm-nél kisebb szemcséket tartalmazó nano ZnO-t hasonlítottuk össze (5-6.diagram). Ennél a kísérletnél se koncentrációfüggőséget, se mérhető mortalitást nem tapasztaltunk.



5. diagram: A harmadik, gipszen végzett kísérletben túlélő adult egyedek átlaga és szórása



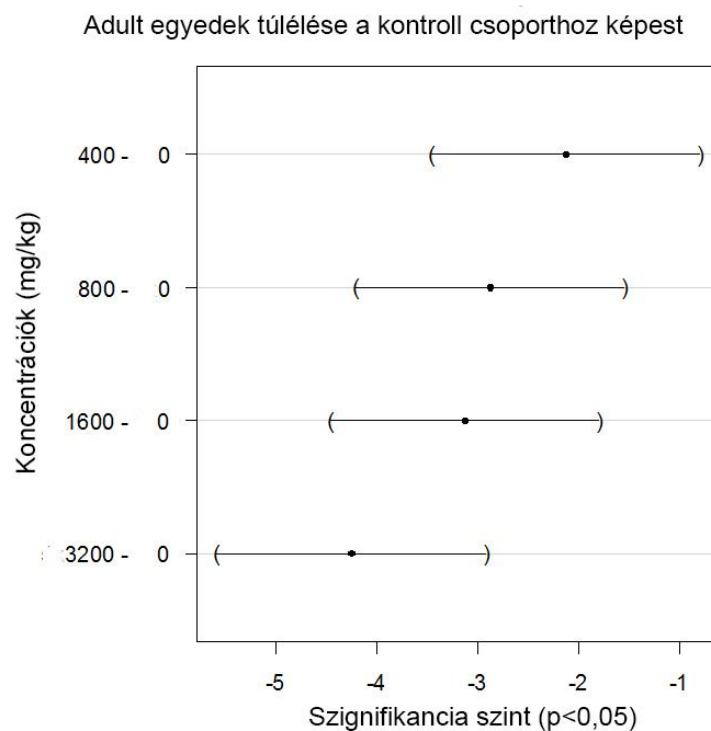
6. diagram: A harmadik, gipszen végzett kísérletben született juvenilis egyedek átlaga és szórása

4.1.2. Főkéísérlet

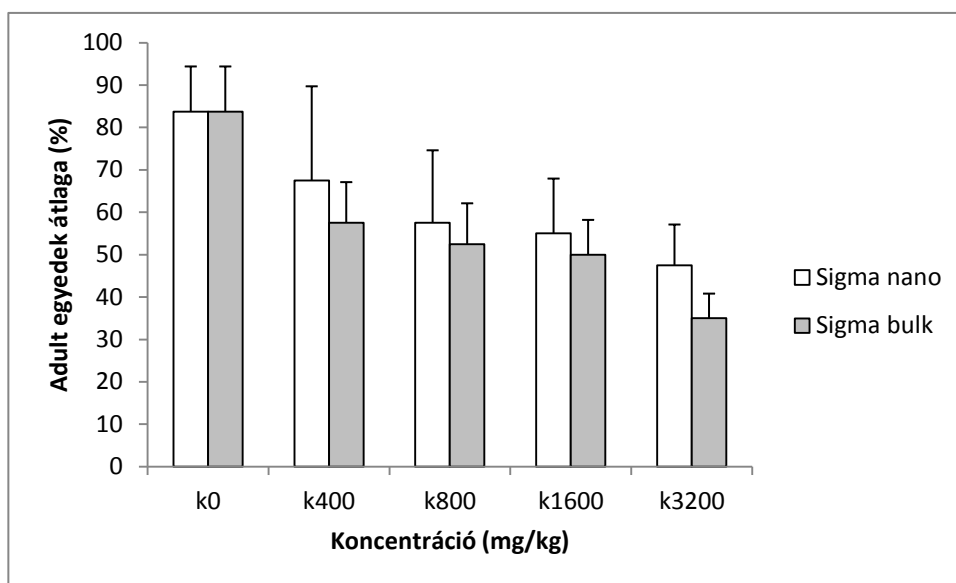
A talaj közegben végzett főteszt megfelelt az érvényességi feltételeknek:

- adult mortalitás átlaga: 16,25 %
- juvenilis egyedek számának átlaga: 127 db
- a juvenilisek számának variációs koefficiense: 23,63 %

Az előtesztekkel ellentétben itt tisztán látszik a koncentrációfüggőség. Az adult egyedek mortalitásán és a reprodukció mértékén jól látszik, hogy mind a nagyszemcsés, mind a nanoméretű ZnO szignifikánsan toxikus volt a *F. candida* fajra, ezt a Dunnett próba is igazolta (7. és 9. diagram). A két anyag között marginálisan szignifikáns különbséget találtunk a juvenilisek esetében. A nagyszemcsés anyag bizonyult relatíve toxikusabbnak (8. és 10. diagram).

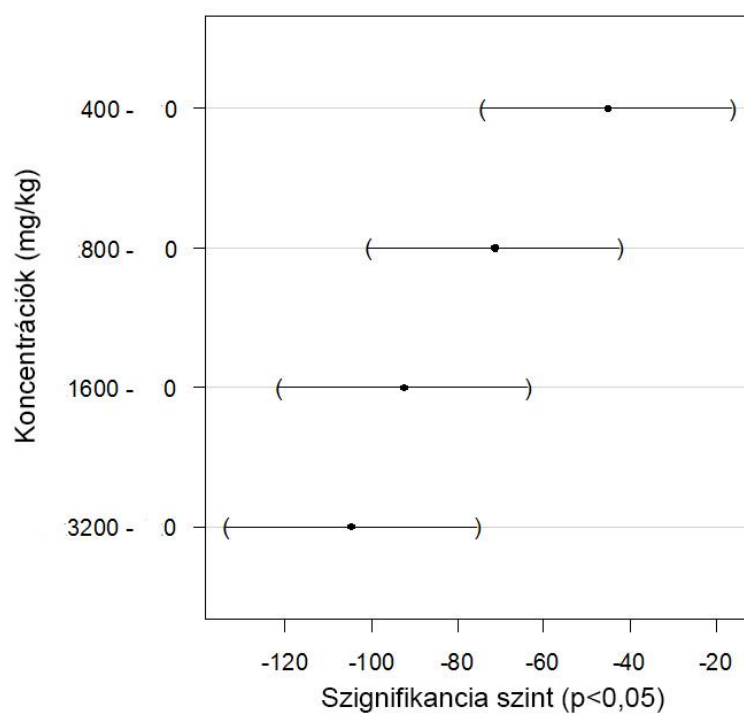


7. diagram: Adult egyedek koncentrációnkénti túlélése a kontroll csoporthoz képest, minden eredmény szignifikáns lett ($p < 0,05$): Az x tengelyen a 0 alatti eredmények számítanak szignifikánsnak.

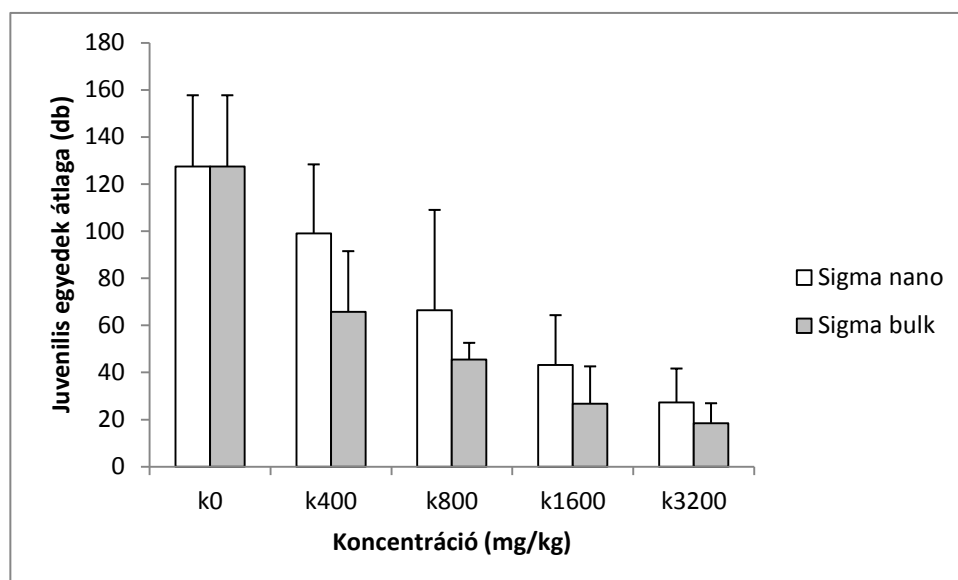


8. diagram: A fő kísérletben túlélő adult egyedek átlaga és szórása

Juvenilis reprodukció csökkenés a kontroll csoporthoz képest



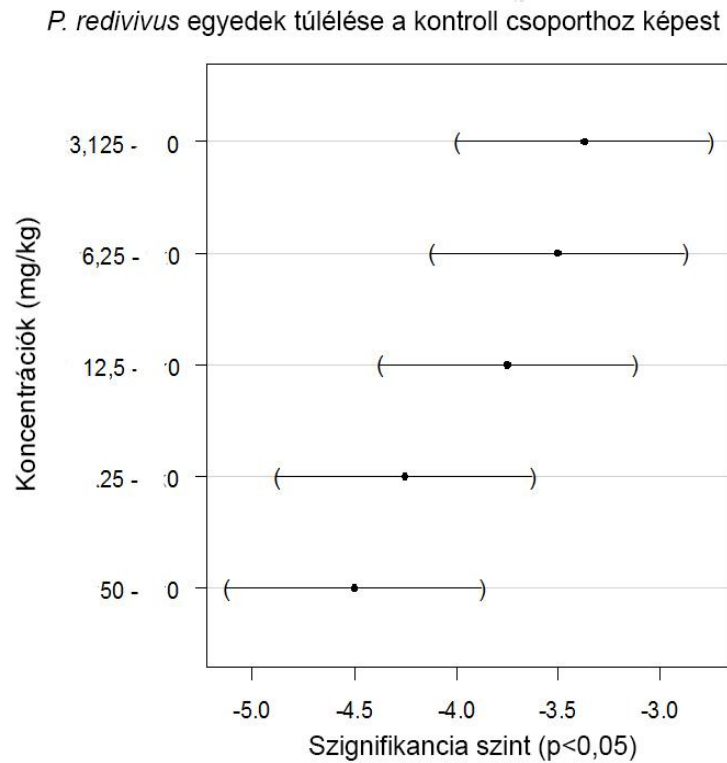
9. diagram: Juvenilis egyedek koncentrációnkénti reprodukciója a kontroll csoporthoz képest, minden eredmény szignifikáns lett ($p < 0,05$): Az x tengelyen a 0 alatti eredmények számítanak szignifikánsnak.



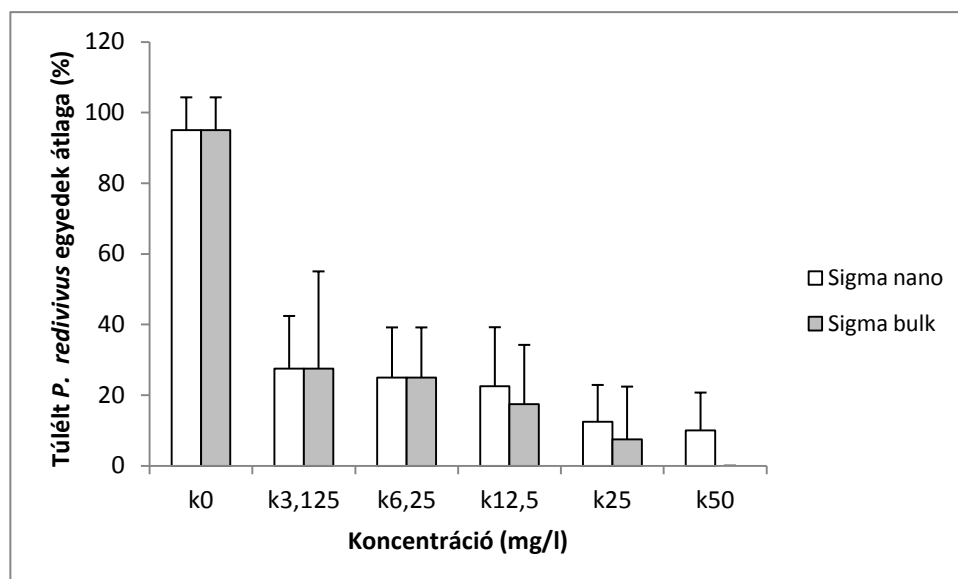
10. diagram: A fő kísérletben született juvenilis egyedek átlaga és szórása

4.2. *Panagrellus redivivus* fajjal végzett kísérlet eredményei

A *P. redivivus*-ra mind a nanoszemcsés, mind a nagyszemcsés (bulk) anyag szignifikáns toxikus hatást mutatott a kontroll csoporthoz képest (11. és 12. diagram).



11. diagram: *P. redivivus* egyedek koncentrációnkénti túlélése a kontroll csoporthoz képest, minden eredmény szignifikáns lett ($p < 0,05$): Az x tengelyen a 0 alatti eredmények számítanak szignifikánsnak.

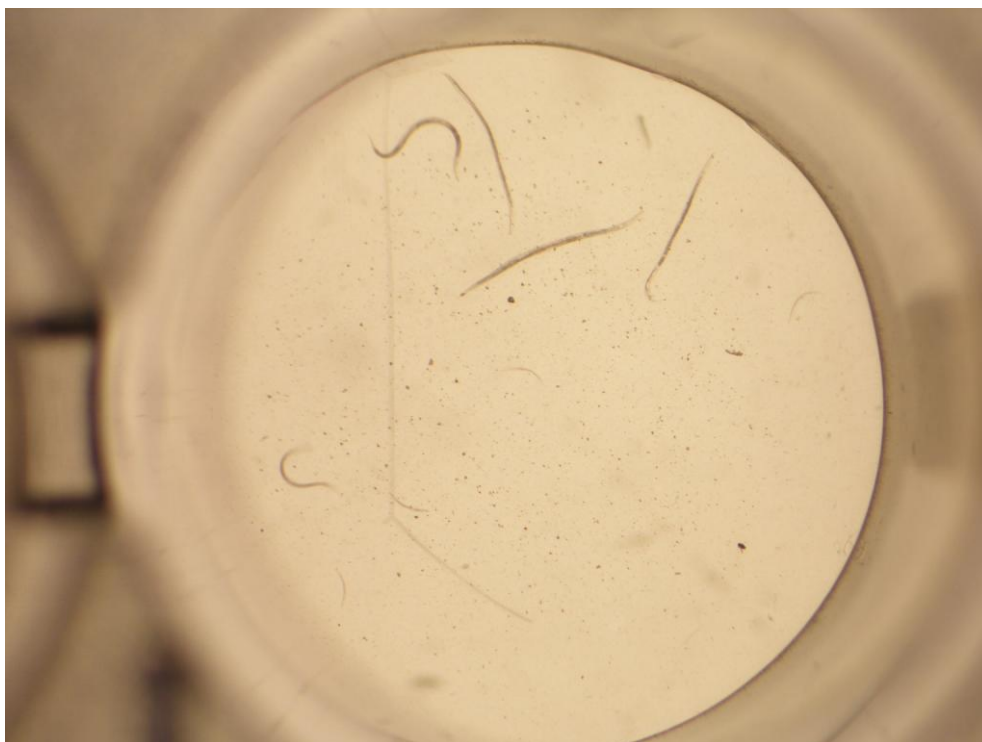


12. diagram: Sigma-Aldrich cég által gyártott nagyszemcsés és nanoszemcsés anyag hatására túlélő *P.redivivus* egyedek átlaga és szórása

A kísérlet végén fényképet készítettünk a leülepedett ZnO és nano ZnO-ról. a legmagasabb, 50 mg/kg-os koncentrációban (15-16. kép). A képeken jól látható, hogy sokkal több kiülepedett anyag keletkezett a nagyszemcsés ZnO hatására.



15. kép: A leülepedett nagyszemcsés anyag az 50 mg/l-es koncentrációban (KISS 2014)



16. kép: A leülepedett nanoszemcsés anyag csapadéka az 50 mg/l-es koncentrációban (KISS 2014)

5. Értékelések, következtetések

A dolgozatomban két talajlakó élőlény érzékenységét vizsgáltam nagyszemcsés és nano ZnO-ra. A vizsgált, különböző szemcseméretű, biztosan nano ZnO-knál a szemcseméretnek nem volt szignifikánsan különböző hatása a *F. candida* mortalitására és reprodukciójára. KOOL et al. (2011) végzett tesztek az *F. candida* fajjal, vizsgálataikban a nano ZnO toxikusnak bizonyult az ugróvillásokra, viszont véleményük szerint nem a ZnO nanorészecskéknél, hanem a kioldódott cink-ionoknak volt toxikus hatása. WAALEWIJN-KOOL et al. (2012) is ugróvillásokkal kísérletezett talajban és talaj szuszpenzióban. A különböző szemcseméretű ZnO-nak reprodukciócsökkentő hatásai voltak. A ZnO szemcseméretének toxicitásában szignifikáns különbséget nem tapasztaltak, és a közeg sem befolyásolta azt. Ezekkel a kísérletekkel ellentétben a miáttalunk végzett főtesztben a mortalitásra is szignifikáns hatása volt mindkét anyagnak. A gyártó által forgalmazott kétféle ZnO közül a nagyszemcsés anyagnak volt marginálisan toxikusabb hatása az *F. candida* reprodukciójára.

IZSÁK (2013) dolgozatában és FOUNTAIN & HOPKIN (2001) vizsgálataiban, hasonlóan a mi előtesztjeinkhez, az OECD 232-es szabvány módosított változatát használták, tehát talaj közeg helyett gipszen végezték az ugróvillás mortalitás és reprodukció tesztet. FOUNTAIN & HOPKIN (2001) úgy találta, hogy ebben a tesztben a ZnO-nak kevésbé toxikus a hatása, mint a talaj közegben végzett kísérletben. IZSÁK (2013) tesztjeiben a nano ZnO-nak nem volt hatása a mortalitásra, a reprodukció viszont szignifikánsan csökkent. Koncentrációfüggést nem tapasztalt. A gipszen végzett kísérleteink kontroll csoportjai nem feleltek meg az OECD szabványban leírt feltételeknek. Arra a következtetésre jutottunk, hogy érdemes elgondolkodni a módszer működőképességén. A szinkron tenyészetek és a kísérlet kontroll csoportjai közötti különbség az élesztő prezentálása és az aktív szén hiánya volt a gipszből. Az Eppendorf cső kupakjaiból láthatóan tudtak táplálkozni az ugróvillások, ezért az aktív szén hiánya lehetett az a faktor, ami miatt nem lettek sikeresek a tesztek. Az okok fényderítésére további kísérletek szükségesek.

A *P. redivivus* fonálféreg fajjal végzett tesztben is szignifikáns mortalitást tapasztaltunk. Ezzel az eredménnyel hasonlóan közölt WILK (2014) a dolgozatában. Ő is a Sigma-Aldrich cég nagyszemcsés és nanonak mondott ZnO-ját tesztelte a *P. redivivus* fajon, és nála a nagyszemcsés anyag volt toxikusabb.

A két vizsgált faj közül a *P. redivivus* bizonyult érzékenyebbnek mind a nagyszemcsés, mind a "nano" ZnO-ra. Ezt az is magyarázhatja, hogy nem volt szerves anyag a rendszerben. Az anyagok közötti toxicitásbeli különbség magyarázatára további vizsgálatok elvégzése szükséges.

6. Összefoglalás

A nanotechnológia elterjedté válása indokolja, hogy az így előállított anyagok veszélyességét, környezeti és egészségügyi kockázatát megfelelőképpen kivizsgáljuk. Azok az anyagok tartoznak ide, amelyek legalább egy dimenzióban 1-100 nm-es mérettartományba esnek, minőségileg új tulajdonságokkal rendelkeznek, így más kockázattal is járnak, mint a nagyszemcsés megfelelőjük. A méret csökkenésével nő a fajlagos felület és a reakcióképesség, ezek megkönnyíthetik a biológiai elérhetőségét és megnövelhetik a toxicitását az anyagoknak.

Dolgozatomban a nagy szemcseméretű és nano cink-oxid (ZnO) toxicitását, és reprodukcióra kifejtett hatását vizsgáltuk két talajlakó szervezeten, a *Folsomia candida* ugróvilla fajon, és a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajon. Az utóbbinál csak az anyagok mortalitásra kifejtett hatását vizsgáló teszteket végeztünk. A nanoméretű ZnO-t széleskörűen alkalmazzák fotokatalitikus tulajdonságai miatt, megtalálható naptejekben, kozmetikai készítményekben és akár felhasználhatják talaj remediáció során is. Négyféle anyagot teszteltem, egy kereskedelmi forgalomban kapható nagyszemcsés ZnO-t és ugyanennek a cégnek, a gyártó adatai alapján 50 nm-nél kisebb részecskéket tartalmazó ZnO-ját hasonlítottam össze egy-egy tesztben. A nano ZnO készítmény utólagos elektronmikroszkópos vizsgálat alapján, a gyártó által közölt adatok ellenére, már nagyszemcsésnek minősült, ezért két (20 nm és 100 nm), a Szegedi Tudomány Egyetem által készített, elektronmikroszkóppal bevizsgált szemcseméretű anyagot is teszteltünk.

A *F. candida* tesztfajjal három előkísérletet végeztünk. Öt koncentrációt használtunk (400 mg/kg, 800 mg/kg, 1600 mg/kg, 3200 mg/kg, 6400 mg/kg), koncentrációnként négy ismétléssel. Kísérleteinket az OECD 232-es szabvány módosított változata alapján végeztük el, talaj helyett olyan közegben, ahol minimalizálhatjuk a dermális expozíció lehetőségét. A három kísérletben nem mutatkozott szignifikáns különbség a szemcseméreték toxicitásában és a reprodukcióra kifejtett hatásában. A kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan csak az első előtesztnél csökkent a reprodukció. Ezek után a főtesztet talaj közegben végeztük el, a teszt megfelelt az érvényességi feltételeknek. Itt már csak négy koncentrációt vizsgáltunk (400 mg/kg, 800 mg/kg, 1600 mg/kg, 3200 mg/kg). A nagyszemcsés és a gyártó által nano mérettartományba sorolt készítményt hasonlítottuk össze. A tesztben már a legkisebb koncentrációnál is szignifikáns, koncentrációfüggő mortalitás növekedést és reprodukció csökkenést tapasztaltunk. A nagyszemcsés anyag bizonyult marginálisan toxikusabbnak.

A *P. redivivus* szabadon élő, bakterivor fonálféreg. Ezzel a tesztfajjal végzett tesztben az előkísérletek alapján nem éreztük indokoltnak az olyan magas koncentrációk használatát, mint az *F.*

candida-nál, így jóval alacsonyabbakkal végeztük a vizsgálatot (50 mg/l, 25 mg/l, 12,5 mg/l, 6,25 mg/l, 3,15 mg/l). Itt is a gyártó nagyszemcsés és a nano ZnO-ját használtuk. Már a legalacsonyabb koncentrációnál is szignifikánsan nőtt a mortalitás a kontroll csoporthoz képest.

A kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy a két talajban élő faj közül a nano ZnO a fonálférgekre fejt ki károsabb hatást. Az ugróvillás fajjal végzett kísérletnél a szerves anyag jelenléte is befolyásolhatta a toxicitást, viszont a koncentrációk jóval töményebb értékeknél sem okoztak olyan mértékű elhullást, mint a fonálférgeknél. A biztosan nano és a nagyszemcsés anyag között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a toxicitásban. A cég által forgalmazott két anyag vizsgálatakor, az *F. candida* reprodukcióját vizsgáló tesztben, a papíron nagyszemcsés bizonyult marginálisan toxikusabbnak. Az *F. candida* faj esetében a különböző expozíciós útvonalakat célzó kísérleteket nem tudtuk értékelni, mivel a módszer nem bizonyult használhatónak.

A továbbiakban érdemes lenne egységes tesztelési rendszert kidolgozni a nanoanyagok és azon belül a nano ZnO vizsgálatára. Ennek a legfontosabb szempontja az ismételhetőség kellene, hogy legyen. Fontos lenne az is, hogy pontos méret meghatározás történjen az anyagok forgalomba hozatala előtt. A dermális felvételt megakadályozó kísérletet érdemes lenne átdolgozni, hogy működő képesé váljon. Kijelenthető, hogy mind a nano, mind a nagyszemcsés ZnO toxikus hatást fejt ki a talajállatokra, ezért a környezetbe nagy mennyiségben kijutatott anyag hosszútávon megváltoztathatja a talaj életközösségeinek a szerkezetét, és negatívan befolyásolhatja a talajban zajló ökológiai folyamatokat.