

36. OTDK DOLGOZAT

**Környezeti elemekből gyakran detektálható gyógyszer- és
peszticid hatóanyagok koktélhatásának ökotoxikológiai vizsgálata**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Vizsgált gyógyszerhatóanyagok.....	5
2.1.1. Gyógyszerhatóanyagok környezeti sorsa és viselkedése	7
2.2. Vizsgált peszticidek.....	10
2.2.1. Peszticidek hatásmechanizmusa, felhasználása	11
2.2.2. Peszticidek környezeti sorsa.....	12
2.3. Nem célszervezetre gyakorolt hatások	13
2.4. Koktéllhatás.....	15
3. Anyag és módszer	18
3.1. Peszticid, gyógyszerhatóanyagok és törzsoldatok.....	18
3.2. <i>Aliivibrio fischeri</i> akut biolumineszcencia gátlási teszt	18
3.3. Zebradánio embrió ZETA teszt.....	19
3.4. Kombinációs Index (CI) módszer	20
4. Eredmények.....	22
4.1. <i>Aliivibrio fischeri</i> biolumineszcencia gátlási teszt	22
4.2. Kombinációs Index (CI) értékek az <i>Aliivibrio fischeri</i> tesztben mért hatásos koncentrációk alapján	25
4.3. <i>Terbutylazine</i> toxicitás-erősítő hatása <i>Aliivibrio fischeri</i> tesztben.....	26
4.4. ZETA teszt eredményei zebradánio (<i>Danio rerio</i>) embrón	28
4.5. Kombinációs Index (CI) értékek az ZETA tesztben mért hatásos koncentrációk alapján	30
4.6. ZETA tesztben megfigyelt szubletális tünetek	31
5. Következtetések javaslatok	36
6. Összefoglalás.....	38
7. Irodalomjegyzék.....	40
8. Köszönetnyilvánítás	48

1. Bevezetés

A gyógyszer és peszticid hatóanyagokat egyaránt többé kevésbé specifikus biológiai aktivitásuk miatt alkalmazzuk. 2019-ben megközelítően két millió tonna peszticidet használtunk fel, míg gyógyszerekből 2189 milliárd dózist (DDD Defined Daily Dose, Napi terápiás dózis) csak 2020-ban világszerte (Sharma et al. 2019, <http29>). Az évente globálisan felhasznált 300 millió tonna szintetikus vegyület jelentős része különböző utakon keresztül a környezeti elemekbe kerülhet. A peszticidek használata ugyan haszonnal járhat a gazdálkodó számára, a környezetbe jutva komoly következményeket okozhatnak eltérő biológiai szinteken (Sharma et al. 2019). Ezt a jelenséget jól megfigyelhettük az előző század második felében például a DDT rovarölő szer kapcsán is, mely számos élőlényre (nem célszervezetre) negatív hatást gyakorolt, továbbá perzisztens tulajdonsága miatt hosszú ideig fennmarad és hosszasan fejti ki káros hatásait.

A táplálékláncba bekerülő gyógyszerhatóanyagok látványos környezeti veszélyeit mi sem példázza jobban, mint a keselyűkfajok (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris*) drasztikus állománycsökkenése Délkelet-Ázsiában, mely közvetlen összefüggésbe hozható a szubkontinens nagymértékű *diclofenac* felhasználásával az állattartásban. Az elhullott *diclofenac*-al kezelt házi állatokat a keselyűk elfogyasztják, ám lényegesen érzékenyebbek a gyógyszer hatóanyagra, már 1 mg/ttkg dózisú *diclofenac* akut veseelégtelenséget okoz néhány napon belül. A környezeti elemekbe jutott xenobiotikumok káros biológiai hatásai azonban nem csak olyan egyértelmű, kirívó módon fejthetik ki hatásukat, mint a *diclofenac* és a keselyűk esete. Sokszor csak viszonylag kis koncentrációkban, de szinte folyamatosan megtalálhatók multikomponens-keverékeként a környezeti elemekben, ezzel krónikus kitettséget jelentve az ökoszisztémák elemeire.

Abban az esetben, ha el is tekintenénk a gyógyszerhatóanyagok mezőgazdasági felhasználástól, akkor is számolnunk kell a civil társadalom által a környezetbe jutott anyagmennyiségtől, csak az Amerikai Egyesült Államokban az emberek évente 19,7 tonna gyógyszert juttatnak a szennyvíz csatornába, mely elhunyt hozzátartozóiktól maradt rájuk (Kümmerer et al. 2010, Oaks et al. 2004).

Átfogó ökotoxikológiai tanulmány nem áll rendelkezésre minden gyógyszer hatóanyagra (Kümmerer et al. 2010). Továbbá a különböző hatóanyagok együttes koktél hatásának vizsgálata a kombinációk hatalmas száma miatt nehézkes. Így azon anyagok kombinációit kell vizsgálni, melyeknél az emberi populáció és a környezet kitettségének esélye magas (Európai Bizottság (COM/2012/0252 final)).

Kutatási munkám során célom a globálisan leggyakrabban detektálható gyógyszer- (*carbamazepine*, *diclofenac*, *ibuprofen*) és peszticid hatóanyagok (*S-metolachlor*, *tebuconazole*, *terbuthylazine*) és keverékeik toxikusságának vizsgálata különböző trofitási szinteken, valamint a vegyületek között fellépő szinergikus, additív és antagonistá kölcsönhatások megállapítása volt. Ehhez első lépésben *Aliivibrio fischeri* (AVF) tesztorganizmummal vizsgálatam a vegyületeket önmagukban és minden lehetséges kombinációikban, majd az eredmények alapján szinergiát mutató keverékeket *Danio rerio* (zebradánió) alternatív gerinces ökotoxikológiai tesztorganizmet használó embriótesztben vizsgáltam. Dolgozatomban részletesen jellemzem a vegyületeket, bemutatom hatásmechanizmusukat, nem célszervezetre gyakorolt hatásukat, környezeti sorsukat, illetve kísérletes kutatómunkám eredményeit.

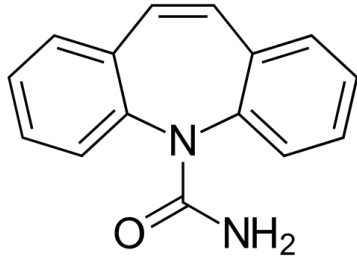
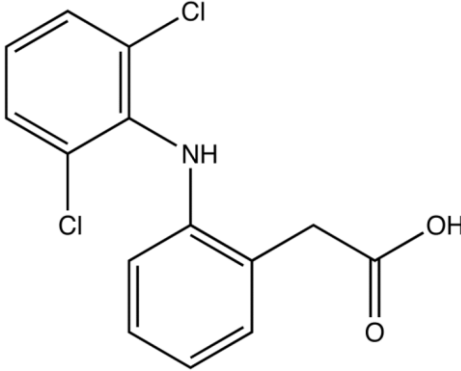
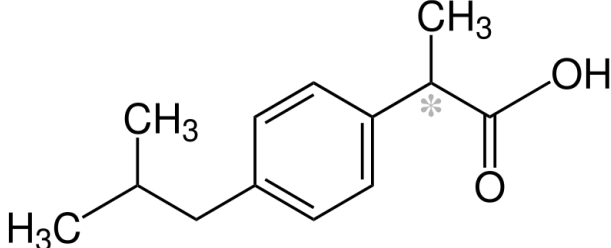
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Vizsgált gyógyszerhatóanyagok

Kutatási munkám során a *carbamazepine* (CBZ), *diclofenac* (DCF) és *ibuprofen* (IBU) gyógyszerhatóanyagokat vontam be vizsgálataimba. Fizikai tulajdonságaikat, szerkezeti képleteiket, elnevezéseiket az 1. táblázatban összegzem.

A *carbamazepine* kémiaailag a triciklikus antidepresszánsok csoportjába tartozó vegyület, antikonvulzív és fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Elsődlegesen epilepszia és

1. táblázat a vizsgált gyógyszerhatóanyagok neve, IUPAC neve, általános fizikai tulajdonságaik és szerkezeti képletük.

Hatóanyag neve	CAS	IUPAC név	Fizikai tulajdonság	Oldékonyság	Források
<i>Carbamazepin</i>	298-46-4	5 <i>H</i> -Dibenzo[<i>b,f</i>] azepin-5-karboxamid	fehér/piszkosfehér por	Vízben, 18 mg/L 25 °C	http1, http2, http10
<i>Diclofenac</i>	15307-79-6	2-[2-(2,6-diklórfenil)aminofenil]etánsav nártium só	fehér por	Vízben, 2430 mg/L 25 °C	http3, http4
<i>Ibuprofen</i>	15687-27-1	(<i>RS</i>)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propánsav	színtelen kristály, jellegzetes szagú	Vízben, 21 mg/L 25 °C	http5, http6, http11
<i>Carbamazepine</i>					http30
<i>Diclofenac</i>					http31
<i>Ibuprofen</i>					http32

neuropátiás fájdalom kezelésére használják, de alkalmazzák még bipoláris zavar és skizofrénia kezelésére is (http16). A *carbamazepine* antikonvulzív hatását a poliszinaptikus reflexek csökkentésére vezethetjük vissza, melyet a feszültség-függő nátrium csatornák blokkolásával fejt ki (http10, http15, Stancova et al. 2017).

A *carbamazepine* gyakori mellékhatásai lehetnek (százból egy ember esetében) álmoság, hányinger és szájszárazság, ritka esetekben okozhat bőrkiütéseket (melyek lehetnek, Stevens-Johnson szindróma tünetei), csontvelő működésének csökkenését (aplasztikus vérszegénység, illetve *agranulocytosis*), zavarodottságot és szuicid gondolatokat (http16, http17, http22).

A *diclofenac* nátrium só egy nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerhatóanyag, benzolecetsav származék nátrium sója. Fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő és lázcsillapító hatással rendelkezik. Hatását a ciklooxygenáz I és II (COX I, II) enzimek nem szelektív reverzibilis gátlása által fejt ki (http18, http19).

Az *ibuprofen* a *diclofenachoz* hasonlóan nem szteroid gyulladáscsökkentő szerek közé tartozik. Egy propionsav származék fájdalom, láz és gyulladáscsökkentő hatással. A ciklooxygenáz I és II enzimeket gátolja, így csökkentve a prosztaglandin képződést, továbbá csökkenti a tromboxán A₂ keletkezését ezáltal csökkentve a vérlemezkék összetapadásának esélyét (http11).

A *diclofenac* hatóanyagot humán és állatgyógyászatban egyaránt alkalmazzák világszerte. Állatok gyulladásos betegségei kezelésekor. Humán alkalmazási területe széles, pl. *dysmenorrhoea* (fájdalmas, görcsös menstruáció), vese-, vagy epekő okozta fájdalom, daganatos megbetegedések okozta fájdalom, különös tekintettel, ha gyulladásos tünetek is jelentkeznek, akut migrén, fogfájás, egyéb fájdalmak és gyulladásos megbetegedések kezelésére használjuk emberek esetében.(http20, http21).

A *diclofenac*-hoz hasonlóan az *ibuprofen* széles használati körébe tartozik *dysmenorrea*, fejfájás, migrén, fogászati beavatkozást követő fájdalom csillapítása, továbbá a csigolyagyulladás, reuma, egyéb csont és ízületi gyulladások kezelésére. Egyes kutatások szerint az *ibuprofen* hosszú idejű kis dózisú alkalmazása segítheti az Alzheimer-kór és Parkinson-kór kezelését, továbbá a mellrák kialakulásának kockázatát akár 50%-kal csökkentheti (Bushra & Aslam 2010).

A *diclofenac* gyakori mellékhatásai (százból több mint egy ember esetében) hányinger, hasmenés, szédülés, fejfájás, étvágytalanság, enyhe kiütések. Gél formájában ekcémát és dermatitist okozhat. Ritka mellékhatási lehetnek (ezerből kevesebb, mint egy embernél) gyomorfekély, szívelégtelenség, májelégtelenség (http23).

Az *ibuorofen* gyakori mellékhatási (száz emberből több mint egyszer) közé tartoznak a hányinger, hányás, szédülés, fejfájás, kimerültség és emésztési zavarok. Komoly mellékhatási lehetnek, mint a nehézlégzés, gyomorvérzés, feldagadt bokák és/vagy véres vizelet vagy a vizelet teljes hiánya (http25).

Ibuprofen és *diclofenac* együttes alkalmazása emberben növeli az emésztőszervi mellékhatások kockázatát, mint a gyomorvérzés, gyulladás, fekély és bél perforáció (http25).

2.1.1. Gyógyszerhatóanyagok környezeti sorsa és viselkedése

A *carbamazepine* (CBZ) elfogyasztása után körülbelül 2-10%-át kiüríti az emberi szervezet, nem meglepő, hogy szennyvíz tisztító telepek befolyóinál gyakran lehet detektálni az anyagot. Hagyományos szennyvíztisztítási technológiával mindössze az anyag kevesebb, mint 10%-át tudják eltávolítani (100-1000 ng/L kiindulási koncentráció), a vegyület CAS1-2 (*conventional activated-sludge* – hagyományos eleveniszapos) technológiájú szennyvíztelepeken és MBR (*membrane bioreactor* – membrán bioreaktor) technológiával szemben is perzisztensnek mutatkozik (Rodríguez-Rodríguez et al. 2010, Radjenovic et al. 2006, Joss et al. 2005). Természetbe való kijutásának is ez a legfőbb forrása. Fejlett országokban 33-6300 ng/L-es koncentrációban található meg a CBZ szennyvíztelepek kifolyóiban. Természetes vizekben kisebb koncentrációban lehet visszamérni a gyógyszerhatóanyagot annak hígulása miatt. 0.1-1100 ng/L-es koncentrációban mutatták ki felszíni vizekben, illetve 1-3600 ng/L-es koncentrációban, talajvízben (Brezina et al. 2017, Hai et al. 2018).

A CBZ-t világszerte 1686 esetben mutatták ki felszíni-, felszín alatti- és ivóvízből az ENSZ régióiban (Dusi et al. 2019). Durán-Alvarez és mtsai (2015) laboratóriumi körülmények között vizsgálták a *carbamazepine*, *naproxen* és *triclosan* fotolitikus hajlandóságát, biodegradációját és transzportját talajban, szennyvízben és olyan régió felszíni vizében, ahol kezeletlen szennyvizet mezőgazdasági öntözésre használtak. Eredményeik alapján a három vegyület közül a *carbamazepine* állt ellen leginkább a fotolitikus degradációnak, biológiai úton pedig talajban és vízben is igen nehezen bomlónak bizonyult anoxikus és aerob körülmények között is. Laboratóriumi körülmények között ásványi tápoldatban az *Aspergillus niger* 9%-os bontásra volt képes tíz napos kísérlet alatt 11,4 mg/L-es kiindulási koncentrációról, míg a *Rhodococcus rhodochrous* 15%-ot bontott el a 9,5 mg/L-es koncentrációjú hatóanyagból huszonnyolc nap alatt (Gauthier et al. 2010). *Trametes*

versicolor 72 óra alatt képes volt lebontani 0,067 mg/L koncentrációjú CBZ 57%-át egy laboratóriumi kísérletben szárított és sterilizett, illetve szennyvíziszap (38 w/v%-nyi lignocellulóz térfogatnövelővel) közegben (Rodríguez-Rodríguez et al. 2010). Xiong és mtsai. 2016-os munkája beszámol két édesvízi mikroalga CBZ biodegradáló képességéről. Kísérletükben *Chlamydomonas mexicana* és *Scenedesmus obliquus* laboratóriumi körülmények között 10 nap alatt képesek voltak lebontani 35 és 28%-át 1 mg/L koncentrációjú CBZ-nek, illetve 21 és 13% át 25 mg/L koncentrációjú gyógyszerhatóanyagnak. A mikroalgák a gyógyszerhatóanyag degradációja során két különböző bomlásterméket állítottak elő: a 10,11-dihydro-10,11-expoxycarbamazepine-t és n-hydroxycarbamazepine-t (Xiong et al. 2016). Bessa és mtsai 2017-es kutatásukban sikeresen beazonosítottak két baktériumtörzset (*Strains Starkeya* sp. C11 és *Rhizobium* sp. C12) melyek szén forrásként képesek hasznosítani a CBZ-t, 10 mg/L-es koncentrációjú gyógyszerhatóanyag 30%-át tudta hasznosítani laboratóriumi körülmények között 30 nap alatt (Bessa et al. 2016).

A diclofenac (DCF) környezetbe történő bekerülésének a fő forrásai a szennyvíz és az állati trágya. Diclofenac-ot megtalálták felszíni- és talajvízben, szennyvízben és ivóvízben is, világszerte 2441 esetben mutatták ki felszíni-, felszín alatti- és ivóvízből (Dusi et al. 2019). Felszíni vizekben 0,1-1 µg/L-es koncentrációkban mutatták ki, talajvízben 2,5 ng/L és 13,48 µg/L közötti értékeket mértek. Franciaországban, Japánban, Svédországban és Spanyolországban ng/L-es koncentrációkban képesek voltak detektálni a gyógyszerhatóanyagot az ivóvízből is (Sathishkumar et al. 2019). A 2014-es Spanyolországi detektálások 18 ng/L-t mutatott ki az ivóvízből és 25 ng/L ásványvizekből (Carmona et al. 2014). Talajból 0,3 µg/kg-és 257 µg/kg közötti koncentrációkban tudták kimutatni az anyagot (Sathishkumar et al. 2019). Kiugró értékeket mértek Pakisztánban 836 µg/L szennyvízben, 4968 µg/kg iszapban, 6632 µg/kg szilárd hulladékban és 257 µg/kg talajban (Ashfaq et al. 2017). Szennyvíztelepeken a DCF eltávolítási hatékonysága nagy szórást mutat 0 és 80% között (Trombini et al. 2019).

A DCF fotodegradációra hajlamos felszíni vízben (Buser et al. 1998). Biodegradálása is lehetséges, irodalmi adatok szerint *Bacillus subtilis* és *Brevibacillus laterosporus* baktérium törzsek képesek teljesen elbontani a gyógyszerhatóanyagot. Előbbi esetben 4'-hydroxy-diclofenac keletkezett, mely az anyavegyülethez hasonlóan toxikus volt *Allivibrio fischeri* testszervezetre (Grandclément et al. 2020). Kruglova és mtsai 2014-es kísérletében laboratóriumi és szennyvíz telepi körülmények között vizsgálták a CBZ, DCF és IBU biodegradációját. A szennyvízkezelés előtt mért koncentrációk a három anyagra vetítve 0,4, 1 és 17 µg/L voltak, a laboratóriumi kísérletben 20 µg /L koncentrációval dolgoztak. Mind a

szennyvíztelepen, mind a laboratóriumban az *IBU* 99% elbomlott, ám a *DCF* és a *CBZ* gyakorlatilag változatlan koncentrációban volt visszamérhető (Kruglova et al. 2014). Bessa és mtsai 2017-es kutatásukban sikeresen beazonosítottak egy baktériumtörzset (*Brevibacterium* sp. D4) mely szénforrásként képes hasznosítani a *DCF*-et, 10 mg/L-es koncentrációjú gyógyszerhatóanyag 35%-át tudta hasznosítani laboratóriumi körülmények között, alternatív szénforrás periodikus adagolásával pedig a *DCF* 90%-át képes volt degradálni a törzs 30 nap alatt (Bessa et al. 2016)

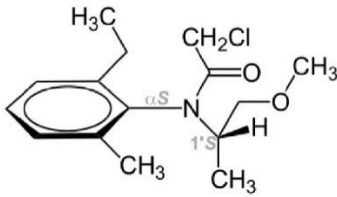
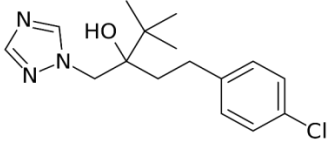
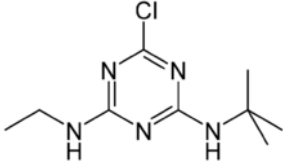
Az elfogyasztott *ibuprofen* közel 15%-a változatlan formából ürül a szervezetből. A *diclofenac* után második leggyakrabban detektálható gyógyszerhatóanyagként 2363 esetben mutatták ki felszíni-, felszín alatti- és ivóvízből (Dusi et al. 2019). Szennyvíztisztítás során 87-90%-át tudják eltávolítani a hatóanyagnak (Trombini et al. 2019). A szennyvízkezelés során tapasztalható nagyfokú eltávolítási hatékonyság ellenére – ezzel együtt azonban mégis ez a legfőbb környezetbe jutási módja a gyógyszerhatóanyagoknak, így az *IBU*-nak is – gyakran detektálható a vegyület különböző környezeti elemekben (Chopra & Kumar 2020, Rutere et al. 2020). Kimutatható volt felszíni vizekben is, Portugáliában 1317 ng/L-es koncentrációt mértek a Lys folyóban (Patel et al. 2019). Pakisztánban is magas koncentrációkat tudtak visszamérni, 1673 µg/L szennyvízben, 6046 µg/kg iszapban, 1229 µg/kg szilárd hulladékban és 610 µg/kg talajban (Ashfaq et al. 2017). Az *IBU*-t detektálták ivóvízből az Amerikai Egyesült Államokban 1,16 ng/L-es koncentrációban, 17,17 ng/L-es koncentrációt mutattak ki Pekingben, 92 ng/L-t Szerbiában.

Az *IBU* fotodegradációja elhanyagolható (Tixier et al. 2003). *Sphingomonas Ibu-2* és *Variovorax Ibu-1* baktériumtörzsek képesek elsődleges szénforrásként használni az *IBU*-t, laboratóriumi körülmények között 500 mg/L közel egészét képesek voltak lebontani hét napos kísérlet alatt (Murdoch & Hay 2013, 2015). *Sphingobium yanoikuyae* és *Pseudoxanthomonas* sp. *DIN-3* szintén képesek elsődleges energiaforrásként hasznosítani az *IBU*-t, utóbbi törzs a *DCF*-et és a *naproxen*-t is képes hasznosítani szimultán. 500 mg/L kiindulási koncentrációjú *IBU* 100, illetve 70%-át tudták degradálni 50 és 100 óra alatt a laboratóriumi kísérletek során (Balciunas et al. 2020, Lu et al. 2019).

2.2. Vizsgált peszticidek

Peszticid hatóanyagok közül az *S-metolachlor*-t (*MTC*), *tebuconazole*-t (*TBZ*) és a *terbuthylazine*-t (*TRB*) vontam be vizsgálataimba, melyek legfontosabb paramétereit a 2. táblázat mutatja be. A három hatóanyagból együtt Magyarországon 2019-ben közel 930 tonnát használtak fel (http26). A gyomirtó szerek együttes alkalmazására is van példa, Európában rutinszerűen használnak több hatóanyagot tartalmazó keverékeket poszt- és preemergens irtásra, például Magyarországon több *MTC* és *TRB* tartalmú szer is rendelkezik használati engedéllyel (Pannacci & Onofri 2016, http27).

2. táblázat a vizsgált peszticid hatóanyagok neve, IUPAC neve, általános fizikai tulajdonságaik és szerkezeti képletük.

Hatóanyag neve	CAS	IUPAC név	Fizikai tulajdonság	Oldékonyság	Források
<i>S-metolachlor</i>	87392-12-9	2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(2S)-1-methoxypropan-2-yl]acetamide	Sárgásbarna olajos folyadék	Vízben 480 mg/L 20°C	http7, http12
<i>Tebuconazole</i>	107534-96-3	1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol	színtelen kristály	Vízben 36 mg/L, pH 5-9, 20 °C	http9, http14
<i>Terbuthylazine</i>	63026-57-3	2-N-tert-butyl-6-chloro-4-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	színtelen kristály	Vízben 9 mg/L, pH 7.4, 25 °C /6.6 mg/L 20 °C	http8, http13
<i>S-metolachlor</i>					http33
<i>Tebuconazole</i>					http34
<i>Terbuthylazine</i>					http35

2.2.1. Peszticidek hatásmechanizmusa, felhasználása

S-metolachlor (MTC) egy klóracetamid szelektív herbicid, elsősorban egyéves és kétszikű gyomnövények ellen használják több mint hetven féle kultúrában pre- és korai postemergens gyomirtásra. A *metolachlor*-nak 4 stabil sztereoizomer változata létezik, két S és két R változata, a herbicid hatásért jelentősebb formában az S izomerek felelősek. A racém *metolachlor* toxikusabb volt nem célszervezetekre, mint a tiszta *S-metolachlor*, továbbá többet is kellett alkalmazni az előbbiből azonos gyomirtó hatás eléréséhez. 1997-óta az *S-metolachlor*-t alkalmazzák széles körben (Poiger et al. 2002, Zhan et al. 2006). Hatását a hosszú zsírsavak (20-26 szénatom) keletkezésének gátlásával fejtí ki, így átjárhatóvá teszi a plazmamembránt, gátolva a sejtnövekedést és osztódást (Lamberth, C. 2016). A *FAE1*¹ gén expressziójának gátlásával akadályozza a lánchosszabbító enzim szintézisét (Neves et al. 2015). Magyarországon a NÉBIH éves szerforgalmi jelentése alapján 2019-ben 373 003 kg került forgalomba a hatóanyagból, ezzel a *glyphosate* és kén után a 3. legnagyobb mennyiségben forgalmazott hatóanyag (http26). A NÉBIH adatbázisa szerint jelenleg 8 *S-metolachlor* tartalmú készítmény rendelkezik érvényes alapengedéllyel. Az *S-metolachlor* és *terbuthylazine* közös alkalmazására is találunk példát, Magyarországon nyolc gyomirtó szer rendelkezik engedéllyel, melyek hatóanyagai az MTC és a TRB, két készítmény ezek közül *mesotrione*-t is tartalmaz (http27).

A *terbuthylazine* (TRB) egy klór-triazin szelektív herbicid, széles körben használják gyomszabályozásra (Watt et al. 2010). Magyarországon a NÉBIH éves szerforgalmi jelentése alapján 2019-ben a 4. legnagyobb mennyiségben forgalmazott hatóanyagként 309 589 kg került forgalomba a szerből (http26). A TRB blokkolja a fotoszintetikus elektrontranszportláncot azáltal, hogy kiszorítja a plasztokinont a D1-es fehérje alegység specifikus kötőhelyéről a II. fotokémiai rendszerben (PS II) (Trebst, A. 2008).

A *tebuconazole* (TBZ) egy triazol típusú széles spektrumú gombaölő szer (Li et al. 2011). Világszerte gabona, zöldség, gyümölcs és csonthéjas kultúrákban alkalmazzák gombás megbetegedések ellen. Gombaölő hatását 14- α -demetiláz enzim gátlásával éri el, mely az ergoszterol szintézis kulcsenzime (Želonková et al. 2019). Magyarországon a NÉBIH éves szerforgalmi jelentése alapján 2019-ben 247 025 kg került forgalomba a szerből (http26), ezzel az 5. legnagyobb mennyiségben forgalmazott hatóanyag volt (a *glyphosate*, kén, *S-metolachlor* és *terbuthylazine* után).

¹ elongáz enzimet kódoló gén

2.2.2. Peszticidek környezeti sorsa

Az *S-metolachlor* fotolízis és bakteriális degradáció útján is bomlik, utóbbit tekinthetjük jelentősebbnek. Az *S-metolachlor* elsődleges bomlástermékei a metolachlor-etánszulfon sav és metolachlor-oxanil sav. Az *MTC* féléletideje 2,5 és 289 nap között van talajban, a fizikai kémiai és biológiai tényezőktől függően (Zemolin et al. 2014). Az *MTC* a *terbuthylazine*-nal együtt a felszíni és talajvizekből leggyakrabban kimutatott peszticidek közé tartoznak. (Milan et al. 2013) Fingler és mtsai Zágráb és külterületeinek talaj és ivóvíz mintáit vizsgálva, a talajvízminták 23%-ában, (100 ng/L-ig) ivóvízminták 54%-ában (15 ng/L-ig) tudták detektálni a peszticid hatóanyagot (Fingler et al. 2016). Munoz és mtsai. 2011-es kutatásában sikeresen azonosítottak egy gomba és egy baktériumtörzset, (*Candida xestobii* és *Bacillus simplex*) melyek 60 és 30%-os hatékonysággal tudták bontani 50 µg/L koncentrációjú herbicid hatóanyagot laboratóriumi körülmények között négy és öt nap alatt (Munoz et al. 2011).

A *tebuconazole* féléletideje laboratóriumi kísérletekben, talajban 86 és 223 nap között volt, függően a talaj biológiai aktivitásától levegő ellátottságától és a talajba jutott *TBZ* enantiomereinek milyenségétől (Li et al. 2015). Más publikációk 49 és 610 nap közé teszik az anyag féléletidejét (Baćmaga et al. 2019). A triazol fungicidek kémiai és fotokémiai bontásnak ellenállnak, összességében perzisztensnek tekinthetők (Wang et al. 2018). Sterilizált talajban bomlása lényegesen lassabb, 180 nap alatt mindössze 10% bomlott el (Li et al. 2015). Már sikerült izolálni több *Serratia* és *Enterobacter* baktériumtörzset, melyek képesek részlegesen (51%-os hatékonysággal) bontani a hatóanyagot elsődleges szénforrásként felhasználva azt 85 mg/L-es koncentrációban (Sehnem et al. 2009). A *TBZ*-t 10 és 1 ng/L-es koncentrációban tudták már detektálni elfolyó tisztított szennyvízből és felszíni vízből (Richardson 2009), de növekvő mértékű felhasználása miatt egyre több környezeti elemből kimutatható vegyület (LeFrancq et al., 2017; Herrero-Fernández et al., 2013, 2016; Masiá et al., 2015).

A *terbuthylazine* tekinthető a legperzisztensebb triazin herbicidnek a környezetben. Féléletideje talajban 5 és 331 nap közé tehető. *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae*, *Lentinula edodes*, *Penicillium brevicompactum* és *Lecanicillium saksenae* gombafajok képesek voltak részlegesen degradálni a herbicid hatóanyagot egy 2012-es kísérletben. Legfontosabb bomlásterméke a cianursav, mely alkil-amin intermedierek útján keletkezik (Pinto et al. 2012). *Janthinobacterium lividum* és *Advenella incenata*, melyek magas nitrát

tartalmú és *terbuthylazine*-al kontaminált mintákból izoláltak, képesek voltak elsődleges szénforrásként hasznosítani a *TRB*-t (Barra Caracciolo et al. 2010). Európában felszíni vizekből 0,01-13 mg/L közötti koncentrációkat tudtak kimutatni (Velisek et al. 2017). Fingler és mtsai Zágráb és külterületeinek talaj és ivóvíz mintáit vizsgálva, a talajvízminták 26%-ában, (25 ng/L-ig) ivóvízminták 45%-ában (20 ng/L-ig) tudták detektálni a peszticid hatóanyagot, továbbá kimutatták deethylterbuthylazine jelenlétét is ivóvízben (14 ng/L-es koncentrációig) (Fingler et al. 2016).

2.3. Nem célszervezetre gyakorolt hatások

A *carbamazepin* $LC_{50} > 4$ mg/L koncentrációban toxikusban bizonyult *Lumbriculus variegatus* és *Chironomus riparius* esetében. Ugyanakkor krónikus kitettség környezetileg releváns koncentrációkban negatív hatásokat indukált Jarvis és mtsai 2014-es mezokozmosz kísérletében. Több csiga faj (*Elimia*, *Physa*, *Lymnaea* és *Helisoma*), zooplankton, fonalas alga és fitotoplankton együtteséből állították össze kísérletüket. Megváltozott viselkedés, gyengült immunválasz, illetve a növekedésben és termékenységben történő változások figyeltek meg 200 és 2000 ng/L-es koncentrációknál is. Ezek az említett szubletális tünetek változásokat okozhatnak az édesvízi ökoszisztémák fajösszetételében és azok arányában (Jarvis et al. 2014). Környezetileg releváns koncentrációkban a *CBZ* káros hatással van az antioxidáns enzimrendszerre, biokémiai folyamatokra és génexpresszióra algákban, kagylókban, rákokban és halakban is (Trombini et al. 2019).

Diclofenac esetében *Daphnia magna* testszervezetre a letális koncentráció 24 óra alatt 486 mg/L. 21 napos kísérlet során EC_{50} 2 mg/L-es koncentrációt tudtak megállapítani, már 0,5 mg/L is jelentősen csökkentette a peték számát (Du et al. 2016). A bengál keselyű (*Gyps bengalensis*) különösen érzékeny a gyógyszerhatóanyagra, mindösszesen 1 mg/tt kg DCF néhány napon belül veseelégtelenséghez és az állat pusztulásához vezet. Délkelet-Ázsiában populációja jelentős mértékben csökkent az elmúlt évtizedekben a *DCF* széleskörű alkalmazásának köszönhetően (Kümmerer et al. 2010, Oaks et al. 2004)

Daphnia magna testszervezetre 24 óra alatt 200 mg/L-es koncentrációjú *IBU* letális. 21 napos kísérletben 3,97 mg/L-ban tudták megállapítani az EC_{50} -et (Du et al. 2016). Ana-Belén Muñiz-González 2021-es tanulmánya szerint az árvaszúnyog (*Chironomus riparius*) lárvák 10%-a elpusztult 48 órányi expozíció után, mindösszesen 0,024 µg/L koncentrációjú *IBU* hatására. A hormonszabályozásban részt vevő *EcR*, *Met*, *Dronc* gének alulszabályozását

eredményezte a vegyület, illetve három hő sokk protein (*hsp70*, *hsp24*, *hsp27*) expressziója is megváltozott (Ana-Belén Muñiz-González 2021).

Kombinálva egyes hatóanyagokat meghaladhatják feltételezett együttes toxikológiai hatásukat. Már 2004-ben leírták az *ibuprofen* és *diclofenac* együttes alkalmazása toxikusabbnak bizonyult *Desmodesmus subspicatus* és *Daphnia magna* tesztszervezetekre, mint a két anyag külön-külön (Cleuvers, M. 2004)

Stancova és mstai kutatásában a *CBZ*, *DCF* és *IBU* kombinált hatását vizsgálták oxidatív stressz paraméterekre *Tinca tinca* korai fejlődésében. 60 µg/L-es koncentrációban *DCF* és *IBU* több jelentős változást indukáltak az antioxidáns védelemben, míg a *CBZ* kisebb változásokat. Kombinálva azonos végkoncentrációnál az anyagoknak nem volt jelentős hatása a tesztszervezetre, ám kisebb koncentrációknál (0.2, 2, és 20 µg/L) jelentősen növekedett a glutation-reduktáz aktivitás, 2 µg/L esetében a glutation-S-transzferáz aktivitás és gátolódott a glutation-peroxidáz működése (Stancova et al. 2017).

Az *S-metolachlor* 15 µg/L koncentrációja tápoldatban csökkentette az *Euglypha rotunda* sejtosztódás intenzitását egy 2018-as kísérletben (Amacker et al. 2018). 2,5 és 5 mg/L-es *MTC* koncentráció 60-70%-al csökkentette *Dunaliella tertiolecta* sejtsűrűségét (Thakkar et al. 2013). Neves és társai kísérletében pedig 7,5 mg/L-es koncentráció jelentősen csökkentette a *Daphnia longispina* utódok számát (Neves et al. 2015). 10 ng/L-es koncentrációjú *MTC* már embriótoxikus hatással van *Crassostrea gigas* lárváira (Gamain et al. 2017). Továbbá megzavarhatja a *Danio rerio* és *Pelophylax perezi* korai fejlődését (Quintaneiro et al. 2017, 2018)

A *tebuconazole* toxicitását vizsgálva 50 és 100 mg/ttkg *TBZ*-vel tápláltak vemhes patkányokat egy 2007-es kísérletben. A kísérlet során a *TBZ* csökkentette a születési súlyt, növelte a vemhesség időtartamát és növelte a születés utáni elhalálozások számát. Hím magzatoknál és újszülötteknél jelentősen növelte az anogenitális távolság a szer, továbbá jelentősen csökkentette a tesztoszteron és növelte a progeszteron és a 17 α – hydroxiprogesteron szintjüket (Taxvig et al. 2007). 12,5 µg/mL *TBZ*-nek 96 órán át kitett *Allium cepa* magvak 50%-a elvesztette csírázókéességét, a kicsírázott egyedek mitotikus indexe 92% volt alacsonyabb a kontrolléhoz képest (Bernardes et al. 2015). Želježić és mstai 2018-as kutatásában a *terbuthylazine* akut hatásait vizsgálták humán limfocita, HepG2 (humán hepatocellularis carcinoma sejtvonal) sejteken *in vitro*. A *TRB* alacsony citotoxicitással rendelkezett a kísérletben, de alacsony szintű genotoxicitást is megfigyeltek (Želježić et al. 2018). Kjeldsen és mtsai 2013-as munkájában peszticid hatóanyagok (és ezen hatóanyagok néhány keverékének) ösztrogén és androgén receptorokra gyakorolt hatását

vizsgálták humán emlő karcinóma MVLN (MCF-7 sejtvonalból származó, mely tartalmaz egy ösztogén válasz luciferáz receptor vektort) és hörcsög CHO-K1 sejtvonalakon, továbbá aromatáz enzim működést is vizsgáltak humán choriocarcinoma JEG-3 sejtvonalon. Az MVLN sejtvonal E2 ((17 β)-ösztro-1,3,5(10)-trién-3,17-diol, 6,81 μ g/L) és TRB (22,971 mg/L) koexpozíciója során megfigyelték, hogy TRB 14%-al felerősítette az E2 által kiváltott fénykibocsátást. Az aromatáz aktivitás kísérletben szintén 0,022971 mg/L koncentrációjú TRB 29 %-al növelte az enzimaktivitást (Kjeldsen et al. 2013). Plhalova és mtsai. 2012-es munkájukban laboratóriumi körülmények között 28 napos kísérletben vizsgálták a TRB hatását 30 napos zebradánió egyedeken. Kórszövettani eltérések a nagy koncentráció (700 és 1000 μ g/L) TRB-vel kezelt csoportok májában volt megfigyelhető. Glutation S-transzferáz aktivitás növekedése megfigyelhető volt a 400, 700 és 1000 μ g/L koncentrációval kezelt egyedekben és glutation-reduktáz aktivitás csökkent 700 és 1000 μ g/L koncentrációjú tesztekben (Plhalova et al. 2012). Lovaković és mtsai (2017) patkányokat 28 napos TRB etetési kísérletben vizsgáltak. A patkányok 0,004, 0,4 és 2,29 mg/tt kg/nap mennyiségű TRB-t kaptak. A vizsgált koncentrációk nem okoztak lipid peroxidációt, ám változást indukáltak az antioxidáns enzim aktivitásban, megemelkedett az össz antioxidáns kapacitás, ami alapján a szerzők valószínűsítik, hogy a TRB képes megzavarni az oxidatív/antioxidatív egyensúlyt. Továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva 19, 22 és 24%-al (0,004, 0,4 és 2,29 mg/tt kg/nap TRB) kevesebbet gyarapodott a kísérleti állatok tömege. Vérplazmájukat vizsgálva, FRAP (ferric reduction ability, antioxidáns kapacitás vizsgálat) szintjük többszöröse volt a negatív kontrollénak (0,004 mg TRB/tt kg/nap, 105.45 0,4 mg TRB/tt kg/nap és 107.70 vs kontroll 7.75 mmol/L) (Lovaković et al. 2017).

A Primextra® Gold TZ, mely *S-metolachlor*-t és *terbuthylazine*-t tartalmazó gyomirtó szer (EC₅₀ 6,58 mg/L) toxikusabbnak bizonyult *Daphnia longispina* testszervezet számára, krónikus 21 napos kísérletben, mint az MTC (EC₅₀ 8,24 mg/L) önmagában (Neves et al. 2015).

2.4. Koktélhatás

A szinergia, szinergizmus, antagonizmus vagy szinergista/antagonista kölcsönhatások a toxikológiai interakciók eltéréseit jelölik. Amikor a keverékek komponensei magukban is aktívak, de nem lépnek interakcióba egymással, megfelelő additivitás modellt kell alkalmazni, mint a dózis addíció (dose addition - DA, más néven koncentráció addíció, concentration addition - CA) vagy független hatás (independent action - IA). Ezekben az esetekben a

szinergizmus jelentése „több, mint additív” az antagonizmus pedig „kevesebb, mint additív” hatást jelöl (Martin et al. 2021).

Belden és mtsai 2007-es munkájában 45 publikációban megtalálható peszticid interakcióval foglalkozó, 303 kísérlet eredményét vizsgálták, melyek több vegyület együttes toxicitásával foglalkoztak MDR-el (model deviation ratio), amit az előre jelzett toxikusság és megfigyelt toxikusság hányadosaként számoltak (0.5 és 2 közötti értékek tekinthetők additívnak). 207 kísérletben (melyből 194 bináris kombináció volt) CA modellt alkalmaztak és ezen esetek 5%-ában az $MDR < 0,5$, azaz antagonizmust állapíthattak meg, illetve az esetek további 5%-ában az $MDR > 2$, azaz szinergizmust állapítottak meg. 59 kísérletnél IA modellt alkalmaztak és további 37-nél egyszerű interakció modellt (SI - simple intraction). A toxikusság előrejelzésének pontossága függött a vizsgált hatóanyagok hatásmechanizmusától (MOA - mode of action). Azonos hatásmechanizmussal rendelkező peszticidek esetében nagyobb pontossággal tudta azok együttes toxikus hatását előre jelezni a CA modell, mint azokban mikor eltérő módon hatnak a vegyületek, ezen esetekben az IA modell bizonyult pontosabbnak. Belden és mtsai arra a következtetésre jutottak, hogy a CA modell konzervatív becslést tesz lehetővé.

Cedergreen 2014-es áttekintő munkájában 194 kétkomponensű peszticid keverék, 21 fém ion keverék és 136 szennyeződésgátló anyag keverék kölcsönhatásaival foglalkozott. Megállapította, hogy a peszticid keverékek 7%-ában a fém ion keverékek 3%-ában és szennyeződésgátló keverékek 26%-ában volt megfigyelhető szinergizmus. A peszticid kombinációk 95%-ánál, melyeknél szinergizmus volt megfigyelhető, tartalmaztak kolineszteráz-gátlókat és azol fungicideket, ezáltal jól leírható, hogy ezen két vegyület csoportnak az interakciója, ám a szennyeződésgátló anyagoknál, már nem lehetett egyértelműen megállapítani, mely anyagcsoportok felelősek leginkább a szinergizmusért.

A szinergizmus és antagonizmus kialakulásának oka lehet a több vegyület együttes jelenléte miatt megváltozott tulajdonságaik hatása több alapvető folyamatra, az adott vegyületek elérhetősége, felvétele, belső transzportja, metabolizációja, kötődési sajátosságai és ürítésük is változhat (Cedergreen 2014).

Martin és mtsai 2021-es publikációjában, melyben 2007 és 2017 közötti időintervallumból származó minegy 1220 toxikológiai kísérlet eredményeit elemezték statisztikai módszerekkel. az 1220 kísérletből 557 esetben állították a cikkek írói, hogy a mért eredmények eltérnek a várt additív modelltől, 388 esetben CA modellre átszámolhatóak voltak az eredmények. Ebből a 388 kísérletből 78 esetben valóban megfigyelhető volt szinergizmus és 58 esetben pedig antagonizmus. A kísérletek közel 65%-ában bináris

kombinációkat vizsgáltak, 17%-ában három komponensű keverékeket és a kísérletek 6%-a négy komponensű keverékeket vizsgált. A vizsgált anyagok eloszlását tekintve 22,2%-ban peszticid illetve biocid hatóanyagok voltak, 16,2%-ban különböző fémek és ionjaik, 12,9%-ban gyógyszehatóanyagok.

3. Anyag és módszer

3.1. Peszticid, gyógyszerhatóanyagok és törzsoldatok

A peszticid és gyógyszer hatóanyagokat a Sigma-Aldrich Ltd.-től szereztük be a toxicitási kísérletekhez. 20 mg/mL koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk *carbamazepine* (Supelco®, CAS 298-46-4, tisztaság $\geq$ 99%), *diclofenac*-só (Supelco®, CAS 15307-79-6, tisztaság $\geq$ 98.5%), *ibuprofen* (Sigma-Aldrich®, CAS 15687-27-1, tisztaság $\geq$ 98%), *S-metolachlor* (Pestanal®, CAS 87392-12-9, tisztaság 98.4%), *tebuconazole* (Supelco®, CAS 107534-96-3, tiszta) és *terbuthylazine* (Pestanal®, CAS 63026-57-3, 99.4%-os tisztaságú) felhasználásával. A törzsoldatok elkészítéséhez a száraz hatóanyagokat dimetil szulfoxidban (DMSO, CAS 67-68-5, $\geq$ 99.99%-os tisztaságú, Fisher Scientific) oldottuk fel. A hatóanyagok együttes vizsgálatához azonos arányban (1:1) kevertük a törzsoldatokat, bináristól a hat tagú keverékekig.

3.2. *Aliivibrio fischeri* akut biolumineszcencia gátlási teszt

A vizsgált gyógyszer- és peszticid hatóanyagok kombinációinak toxicitását akut 30 perces Microtox® teszttel (ISO 11348) vizsgáltam Microtox® Model 500 Analyzer (SDI) segítségével.

Tesztsszervezetként *Aliivibrio fischeri*-t (DSM 7151, NRRL B-11177) alkalmaztam. Az *A. fischeri* (AVF) egy Gram-negatív, pálcika alakú, fakultatív anaerob biolumineszcens tengeri baktérium ([http28](http://28)). Széles körben alkalmazzák laboratóriumokban.

Fénykibocsátása szigorúan szabályozott folyamat, mely során a luciferáz enzim FMNH₂ (flavinmononukleotid redukált formája), oxigént és egy alifás aldehidet (RCHO) flavinmononukleotiddá (FMN), vízzé és hosszúláncú szerves savvá alakítja (Bose et al. 2007). A fénykibocsátásért a *luxCDABEG* gének felelősek, ezen gének szabályozása pedig eredendően összefügg a *quorum sensing* jelenséggel, mely kémiai jeleken alapuló intercelluláris kommunikáció (Miyashiro & Ruby 2012). Az *A. fischeri* esetében a baktériumsejtek autoinduktor szignál molekulákat termelnek és egy bizonyos koncentráció elérése után világítani kezdenek (Miyashiro & Ruby 2012). A fentebb leírt kémi reakciók metaboikus energiát alakítanak át látható fénné, így ha a baktériumok metabolikus aktivitása sérül, a fénykibocsátás is csökkenni fog. A peszticid- és gyógyszer hatóanyagok és

keverékeinek toxicitását a biolumineszcenciára gyakorolt gátló hatásuk alapján határoztam meg.

A kísérletekhez a 20 mg/mL koncentrációjú *carbamazepine* (CBZ), *diclofenac* (DCF), *ibuprofen* (IBU), *S-metolachlor* (MTC), *tebuconazole* (TBZ), *terbuthylazine* (TRB) törzsoldatokból és 2 m/m%-os NaCl oldatból készítettem el a kilenc tagú hígítási sorokat két ismétlésben. A hígítási sorok koncentrációtartománya mind az egyedi anyagok, mind a keverékek esetében 100 mg/L és 6,25 mg/L közötti volt. A vegyületek és keverékek 10, 20, 50, 80, 90 és 95%-os fénykibocsátás gátlást okozó effektív koncentrációit (EC) MicrotoxOmni® program segítségével (version 1.1, AZUR Environmental Ltd.) határoztam meg.

3.3. Zebradánió embrió ZETA teszt

A hatóanyagok és kombinációik toxikus hatásának vizsgálatára bakteriális testszervezet mellett alternatív ökotoxikológiai testszervezetet is alkalmaztunk, egy gerinces fajt, a zebradániót (*Danio rerio*).

A zebradánió egy Dél-Ázsiába édesvízeiben honos halfaj, mely széles körben alkalmazott fejlődésbiológiai, molekuláris genetikai, toxikológiai, illetve gyógyszer fejlesztés-kutatási területeken. Számos, humán fehérjét kódoló gén ortológja megtalálható a zebradánióban (mintegy 70%), melyek különböző xenobiotikumok metabolizációjában vesznek részt (összehasonlításképpen az egerek genomjában ezen gének 83%-ának ortológja található meg). Olcsó tenyésztése, gyors szaporodása és egyedfejlődése, valamint kis mérete is hozzájárul széles körű használatához laboratóriumokban (Van Wijk et al. 2016).

A kutatási munka során ZETA (*zebrafish embryo toxicity assay*) módszert alkalmaztunk. A laboratóriumi AB zebradánió vonalat 30 nőstényből és 30 hímiből álló tenyészcsoporthoz tartjuk a MATE Környezettoxikológia Tanszékén, Tecniplast ZebTEC recirkulációs rendszerben (Tecniplast Spa, Olaszország). A halakat $25,5 \pm 0,5$ °C-on (rendszer víz: pH $7,0 \pm 0,2$, vezetőképesség 550 ± 50 µS/cm) és 14:10 óra fény: sötét ciklus mellett tartottuk. Az állatokat naponta kétszer etettük száraz granulált táplálékkal (Zebrafeed 400-600 µm, Sparos Lda., Portugália), amelyet hetente kétszer frissen kikelt élő *Artemia salina*-val egészítettünk ki. A szaporítani kívánt halakat a kísérlet napja előtti délután válaszfallal ellátott szaporító medencékbe helyeztük. Másnap reggel a válaszfalakat eltávolítottuk, majd az ikrákat összegyűjtöttük, és 10 cm-es Petri-csészékbe helyeztük rendszer vízbe. A teszteket Haq és mtsai 2016-os publikációjának megfelelően állítottuk össze,

azzal a különbséggel, hogy négy párhuzamos ismétlésben vizsgáltunk minden koncentrációt, illetve a lemezek összeállításánál nem párologtattuk el a vizsgálni kívánt hatóanyagok oldószerét. A tesztekhez 24 nyílásos polisztirol lemezeket (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd.) használtunk, melybe nyílásonként 5-5 embriót helyeztünk, ≤ 2 hpf (hours post – fertilization), 4-32 sejtes állapot között. Az embriókra 2 mL vizes oldatot töltöttünk, melyek tartalmazták vizsgálni kívánt hatóanyagot, illetve hatóanyagok-keverékeket. Több hatóanyag együttes vizsgálatakor az *Aliivibrio fischeri* teszttel megegyezően 1:1 arányban használtuk fel azokat, öt tagból álló felező hígítási sorokat alkalmaztunk, a keverékeke esetében 60, 30, 15, 7,5 és 3,75 mg/L-es koncentrációkkal. Lemezenként 2-2 oldószeres és oldószer nélküli kontrollt alkalmaztunk. Az oldószer maximális alkalmazott koncentrációja sehol nem haladta meg a 0,3 %-ot. Az embriófejlődést 72, 96 és 120 óránál vizsgáltuk meg fénymikroszkóp segítségével. A mikroszkópos vizsgálatok során Berry és mtsai 2006-os publikációjában leírtakhoz hasonlóan, mortalitást, kikelést és az esetleg megjelenő morfológiai abnormitásokat jegyeztük fel. A mortalitásokból származó adatokat GraphPad Prism program segítségével nem lineáris regressziós görbére illesztettük és LC értékeket számoltunk.

3.4. Kombinációs Index (CI) módszer

A gyógyszer és peszticid hatóanyagok kombinációinak szinergista, antagonista és additív kölcsönhatásait az úgy nevezett Kombinációs Index módszerrel (Combination Index - CI) jellemeztük.

$${}^n(CI)_x = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_{j=1}^n \frac{(Dx)_{1-n} \{ [D]_j / \sum_1^n [D] \}}{(Dm)_j \{ (f a_x)_j / [1 - (f a_x)_j] \}^{1/m_j}}$$

Amiben ${}^n(CI)_x$ - a Kombinációs Index (CI) n számú anyag esetében x%-os gátlásnál. $(Dx)_{1-n}$ - a kiválasztott n számú vegyület összesített koncentrációja, melyek x%-os gátlásért felelősek. $\{ [D]_j / \sum_1^n [D] \}$ – az n hatóanyag koncentrációinak arányossága x%-os gátlás esetében. $(Dm)_j \{ (f a_x)_j / [1 - (f a_x)_j] \}^{1/m_j}$ ami a hatóanyagok különálló koncentrációi, mely x%-os gátlást okoznak, ahol a Dm a medián hatás koncentrációja, $f a_x$ részleges gátlás x%-os gátlás esetén és m a medián hatás értékének meredeksége (Yang et al. 2017).

Keverékek hatásait Chou és Talalay rendszereztek: ha $CI < 1$ szinergizmusról beszélünk, $CI = 1$ esetében additív hatásról (koncentráció összegzés), $CI > 1$ esetében antagonista hatást állapíthatunk meg (Chou és Talalay 1984).

Részletesebb osztályozással Chou egy későbbi publikációja szolgál, miszerint: ha $CI < 0.1$ nagyon erős a szinergizmus, ha $CI=0.1-0.3$ erős a szinergizmus, $CI=0.3-0.7$ a szinergizmus, $CI=0.7-0.85$ mérsékelt a szinergizmus, $CI=0.85-0.90$ gyenge a szinergizmus. $CI=0.90-1.10$ közötti érték esetén közel additív hatásról beszélhetünk. $CI=1.10-1.20$ gyenge antagonizmust $CI=1.20-1.45$ mérsékelt antagonizmust, $CI=1.45-3.3$ antagonizmust, $CI=3.3-10$ erős antagonizmust, $CI > 10$ nagyon erős antagonizmust állapíthatunk meg (Chou 2008).

A Kombinációs Index (CI) értékeket CompuSyn program (The ComboSyn, Inc.) (Chou és Martin, 2005) segítségével határoztuk meg. A szinergista, additív és antagonista kölcsönhatások meghatározásához hat koncentráció-válasz pontot alkalmaztunk (EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{80} , EC_{90} és EC_{95}) 2, 3, 4, 5 és 6 hatóanyagot tartalmazó keverékeknel.

A *terbuthylazine* hatóanyag önmagában alkalmazva nem gyakorolt citotoxikus hatást az *Aliivibrio fischeri*-re, így kombinált hatása más hatóanyaggal vagy hatóanyagokkal nem értelmezhető szinergizmusként, additív hatásként vagy antagonizmusként. Abban az esetben, ha az azt tartalmazó keverék effektív koncentrációja kisebb, mint a nem tartalmazó keverék esetében, akkor a hatását toxicitás-erősítésnek (fokozásnak vagy növelésnek) tekintjük, így nem alkalmazható a Kombinációs Index számítás ezen esetekben (Chou 2008). A *terbuthylazine* toxicitás-erősítő hatását százalékban fejeztük ki, amellyel szükséges lenne megemlíteni a *terbuthylazine*-t nem tartalmazó keverék koncentrációját, hogy ugyanazt a hatást érjük el, mint ami a *terbuthylazine*-t tartalmazó keverék esetében mérhető. A következő egyenletet használtuk a nem toxikus vegyület erősítő hatásának (E%) számolására:

$$E\% = \{1 - [EC_{xA} * n / (n+1) / EC_{xB}]\} * 100$$

ahol

EC_{xA} – x% biolumineszcencia gátlást okozó effektív koncentrációja a nem-toxikus hatóanyagot tartalmazó keveréknek,

n – a nem-toxikus vegyületet nem tartalmazó keverékben megtalálható hatóanyagok száma,

EC_{xB} – x% biolumineszcencia gátlást okozó effektív koncentrációja a nem-toxikus hatóanyagot nem tartalmazó keveréknek.

4. Eredmények

4.1. *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt

A carbamazepine (CBZ), diclofenac (DCF), ibuprofen (IBU), S-metolachlor (MTC), tebuconazole (TBZ), és terbuthylazine (TRB) és keverékeik effektív koncentrációit, melyek 10, 20, 50, 80, 90 és 95%-ban gátolták az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcenciáját a 3. táblázatban mutatom be.

Különböző hatóanyagok azonos biolumineszcencia gátláshoz szükséges koncentrációja nagymértékben eltérő volt. A gyógyszerhatóanyagok közül a két nem szteroid gyulladáscsökkentő szer bizonyult a legtoxikusabbnak. 50%-os fénykibocsátás gátlásnál megfigyelhető volt, hogy a DCF és az IBU toxikusabb a tesztszervezetre nézve, mint a carbamazepine. A 80% - 95%-os biolumineszcencia gátlás esetében a DCF volt a legtoxikusabb.

Peszticidek esetében a terbuthylazine nem mutatott semmilyen citotoxikus hatást a vizsgált koncentrációkban. A tebuconazole gátolta legintenzívebben a biolumineszcenciát a peszticidek között, a DCF-hez és IBU-hoz hasonló eredményeket produkált, azonban magasabb effektív koncentrációkból a DCF-hez viszonyítva kevésbé gátolta a fénykibocsátást, míg IBU-hoz képest toxikusabb volt az *A. fischeri* számára.

Kétkomponenses keverékek közül 10%-os gátlásnál az IBU+TRB kombináció bizonyult a legtoxikusabbnak 1 mg/L-es effektív koncentrációval, ám 50%-os gátlásnál már a DCF+IBU kombináció bizonyult toxikusabbnak, 12 mg/L-es értékkel. 80, 90 és 95%-os gátlás esetében is a DCF+IBU kombináció bizonyult a legpotensebbnek. A legkevésbé toxikus bináris kombinációnak összességében a MTC+TRB-t tekinthetjük.

Három komponensű keverékek esetében a 10 és 20%-os gátlásnál a CBZ+IBU+MTC, CBZ+IBU+TRB, DCF+IBU+TRB, illetve IBU+MTC+TBZ és IBU+MTC+TRB tekinthetőek a legtoxikusabbnak 2 és 6 mg/L közé eső hatásos koncentrációkkal. 50, 80, 90 és 95%-os fénykibocsátás inhibíciónál a csak gyógyszerhatóanyagokat tartalmazó keverék bizonyult a legtoxikusabbnak, érdemes továbbá megjegyezni, hogy e keverék kisebb koncentrációinak hatása nem sem marad el sokkal a fentebb említett hármas keverékekétől.

Négy anyagot tartalmazó keverékek közül EC₁₀-et és EC₂₀-at a CBZ+IBU+MTC+TRB kombináció mutatta a legkisebb hatásos koncentrációt 1 és 4 mg/L-es értékkel. 50%-os gátlást a DCF+IBU+TBZ+TRB tudott előidézni a legkisebb koncentrációval, míg 80, 90 és 95%-os inhibíciónál a CBZ+DCF+TBZ+TRB kombináció volt a legtoxikusabb. Az öt komponensű

keverékek közül 80, 90 és 95% os gátlást a *CBZ*-t nem tartalmazó keverék tudta okozni a legkisebb koncentrációban.

Mind a hat vizsgált hatóanyagot tartalmazó keveréknél több toxikusabb mix is van a vizsgáltak között, bármely elemszámot tartalmazó csoportban.

A hatóanyag kombinációk EC_{10} értéke átlagosan 8 és 9 mg/L közé tehető, a legtoxikusabb keverékek már 1-2 mg/L koncentrációnál kifejtették hatásukat, míg néhány keverék az átlag két-háromszorosát meghaladó koncentrációnál tudta csak kifejteni hatását a tesztstruktúrára. Az összes kombinációt figyelembe véve 10% os gátlásnál az *IBU+TRB* és *CBZ+IBU+MTC+TRB* keverékek bizonyultak a legtoxikusabbnak 1 mg/L-es hatásos koncentrációval.

A fénykibocsátás 20% os gátlás esetén szintén az *IBU+TRB* kombináció bizonyult a legtoxikusabbnak az összes keverék közül. EC_{50} értéke a *DCF+IBU*, *CBZ+DCF+IBU* keverékeknek volt a legalacsonyabb mindössze 12 mg/L. 95%-os effektív koncentrációnál szintén ez a két kombináció volt a legtoxikusabb 62 és 54 mg/L EC_{95} értékkel.

Érdemes megfigyelnünk továbbá, hogy az önmagában nem toxikus *terbuthylazine*-t tartalmazó több keverék toxikusabbnak bizonyult 50%-os gátlásig az összes kiindulási hatóanyagnál.

3. táblázat A vegyületek és keverékeik 10, 20, 50, 80, 90 és 95%-os biolumineszcencia gátlást előidéző koncentrációi mg/L-ben kifejezve *Aliivibrio fischeri* tesztorganizmen 30 perces kontaktidő esetén mérve. 1: *carbamazepine*, 2: *diclofenac*, 3: *ibuprofen*, 4: *S-metolachlor*, 5: *tebuconazole*, 6: *terbuthylazine*. N.t. – nem toxikus adott koncentrációban.

	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₈₀	EC ₉₀	EC ₉₅		EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₈₀	EC ₉₀	EC ₉₅
	mg/L							mg/L					
1	4	14	86	520	1478	3866	2+3+4	4	8	22	64	118	208
2	7	13	27	50	77	107	2+3+5	10	20	54	144	258	442
3	2	5	23	96	222	471	2+3+6	2	4	14	38	68	114
4	55	100	265	715	n.t.	n.t.	2+4+5	6	8	20	42	66	98
5	8	14	32	74	120	188	2+4+6	3	6	22	82	177	360
6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2+5+6	20	28	51	93	132	182
1+2	12	16	28	50	70	94	3+4+5	2	4	30	178	488	1240
1+3	6	12	40	120	230	418	3+4+6	2	5	33	226	694	1953
1+4	16	32	88	232	408	688	3+5+6	7	15	50	169	345	665
1+5	24	32	52	80	108	136	4+5+6	32	52	114	250	394	598
1+6	18	36	120	n.t.	n.t.	n.t.	1+2+3+4	10	14	30	64	96	140
2+3	2	4	12	26	40	62	1+2+3+5	12	18	36	72	108	156
2+4	10	14	28	56	84	120	1+2+3+6	5	9	28	88	174	324
2+5	12	18	34	64	92	126	1+2+4+5	10	16	38	88	144	224
2+6	4	10	32	102	202	380	1+2+4+6	6	12	34	99	186	332
3+4	6	12	50	184	396	804	1+2+5+6	8	12	24	50	78	116
3+5	8	16	56	192	394	760	1+3+4+5	4	12	58	254	598	1312
3+6	1	2	18	102	272	672	1+3+4+6	1	4	40	376	1393	4661
4+5	12	20	36	64	88	116	1+3+5+6	2	8	48	294	842	2214
4+6	30	80	428	2278	6054	14896	1+4+5+6	2	8	110	1431	6415	25568
5+6	6	16	76	350	850	1918	2+3+4+5	6	12	30	70	114	180
1+2+3	4	6	12	24	38	54	2+3+4+6	2	6	20	62	124	232
1+2+4	8	12	28	64	100	154	2+3+5+6	3	6	17	55	107	199
1+2+5	20	30	54	98	138	190	2+4+5+6	4	8	27	91	186	360
1+2+6	6	12	28	62	100	154	3+4+5+6	2	6	36	184	476	1140
1+3+4	2	6	40	228	630	1610	1+2+3+4+5	8	14	38	100	172	284
1+3+5	10	20	66	214	426	802	1+2+3+4+6	2	6	22	74	150	286
1+3+6	2	6	38	218	602	1532	1+2+3+5+6	4	8	22	56	96	158
1+4+5	34	56	126	282	454	702	1+2+4+5+6	4	9	30	106	220	431
1+4+6	31	55	147	394	699	1187	1+3+4+5+6	2	6	42	290	886	2470
1+5+6	20	40	168	684	1548	3288	2+3+4+5+6	8	12	22	40	56	78
							1+2+3+4+5+6	2	6	24	100	228	482

4.2. Kombinációs Index (CI) értékek az *Aliivibrio fischeri* tesztben mért hatásos koncentrációk alapján

A carbamazepin-t, diclofenac-ot, ibuprofen-t, S-metolachlor-t és tebuconazole-t tartalmazó keverékek CompuSyn szofverrel számolt kombinációs index értékei a 4. táblázatban találhatóak.

4. táblázat. A carbamazepin-t (1), diclofenac-ot (2), ibuprofen-t (3), S-metolachlor-t (4) és tebuconazole-t (5) tartalmazó keverékek *Aliivibrio fischeri* tesztrendszerben 10, 20, 50, 80, 90 és 95%-os biolumineszcencia gátlást okozó hatásos koncentrációinál megfigyelhető Kombinációs Index (CI) értékek. Szinergista hatás: $CI < 1$ (félkövér), additív hatás: $0.9 < CI < 1.1$ (dőlt), antagonista hatás: $CI > 1.1$

Keverék	CI értékek az egyes hatásos koncentrációkon AVF tesztben					
	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₈₀	EC ₉₀	EC ₉₅
1+2	2.14224	1.30064	0.74870	0.54590	0.47777	0.42373
1+3	2.10983	1.67359	1.17212	0.75546	0.59395	0.47709
1+4	1.95583	1.39831	0.70669	0.38927	0.29616	0.24348
1+5	4.16699	2.41559	1.14282	0.62217	0.48393	0.37449
2+3	0.60745	0.57391	0.52490	0.39664	0.34958	0.33486
2+4	0.74328	0.66792	0.62913	0.59572	0.57817	0.55362
2+5	1.50856	1.43097	1.23814	1.07117	0.97868	0.88367
3+4	1.48468	1.27061	1.25164	1.10684	<i>1.04547</i>	<i>1.00268</i>
3+5	2.39065	2.20278	2.18286	2.32601	2.51962	2.77160
4+5	0.83318	0.83811	0.63746	0.47981	0.39938	0.33169
1+2+3	1.11185	0.72846	0.39913	0.25975	0.22986	0.19890
1+2+4	<i>1.00023</i>	0.69078	0.53423	0.49565	0.48114	0.48639
1+2+5	3.18572	2.36276	1.53239	1.15745	<i>1.00942</i>	<i>0.90406</i>
1+3+4	0.48088	0.57809	0.83155	<i>1.06315</i>	1.24916	1.47175
1+3+5	2.74698	2.35084	1.98572	1.86802	1.91106	2.01618
1+4+5	4.14002	3.00702	2.00404	1.59349	1.47476	1.4321
2+3+4	0.83400	0.79218	0.66912	0.68072	0.71832	0.78081
2+3+5	2.42757	2.40433	2.14447	2.11715	2.21642	2.36633
2+4+5	0.53895	0.45097	0.51062	0.48821	0.48530	0.47321
3+4+5	0.41047	0.38062	0.81720	1.52054	2.20795	3.20470
1+2+3+4	2.12983	1.31022	0.77658	0.54187	0.45434	0.40284
1+2+3+5	2.86411	1.97067	1.18294	0.82917	0.71389	0.63606
1+2+4+5	1.23976	<i>0.98557</i>	0.84448	0.81026	0.81819	0.82512
1+3+4+5	0.84214	<i>1.08823</i>	1.36330	1.75165	2.12914	2.62448
2+3+4+5	1.11948	1.11229	<i>0.92173</i>	0.79634	0.75684	0.74343
1+2+3+4+5	1.55640	1.25452	<i>1.02751</i>	<i>0.94926</i>	<i>0.93651</i>	<i>0.95247</i>

Sikerült több esetben is szinergista kölcsönhatást megfigyeli, és megállapítható, hogy a koncentráció növekedésével általánosságban erősödött is ez a kölcsönhatás. A *CBZ+IBU+MTC*, *IBU+MTC+TBZ* és *CBZ+IBU+MTC+TBZ* keverékek esetben megfigyelhető volt, hogy kisebb koncentrációkban szinergista és additív hatások voltak megfigyelhetők, melyek a koncentrációk növelésével antagonizmus irányába változtak.

Az *IBU+TBZ*, a *CBZ+IBU+TBZ*, *CBZ+MTC+TBZ*, illetve a *DCF+IBU+TBZ* esetében minden effektív koncentráción csak antagonista hatás volt megfigyelhető.

DCF+IBU, *DCF+MTC*, *MTC+TBZ*, a *DCF+IBU+MTC* és *DCF+MTC+TBZ* minden hatásos koncentrációban szinergizmust volt mérhető.

4.3. *Terbuthylazine* toxicitás-erősítő hatása *Aliivibrio fischeri* tesztben

A *terbuthylazine* önmagában az alkalmazott koncentrációkban nem volt toxikus az *Aliivibrio fischeri* tesztorganizmra nézve, így kombinált hatása más hatóanyaggal vagy hatóanyagokkal nem tekinthető szinergistának, additívnek vagy antagonistának, hanem egyoldalú toxicitás erősítésnek, fokozásnak tekintjük, ezáltal Kombinációs Index nem értelmezhető (Chou, 2008). A *terbuthylazine* citotoxicitást fokozó hatását a keverékekben százalékos értékekben fejeztük ki, melyeket az 5. táblázat foglalja össze.

A *terbuthylazine*-nak semmilyen fokozó hatása nem volt a *carbamazepin*-re, továbbá gátló hatást fejtett ki a két másik peszticid hatóanyagra minden vizsgált koncentráció esetében, mikor csak e három anyag volt megtalálható a keverékben.

A *CBZ+TRB* és *MTC+TBZ+TRB* keverékek kivételével minden esetben a *terbuthylazine* erős toxicitásfokozó hatását lehetett megfigyelni az alacsony hatásos koncentrációknál. Sok esetben a koncentráció növekedésével arányosan csökkent a *terbuthylazine* toxicitás-erősítő hatása. Ez alól kivételt képez a *diclofenac*-ot, *ibuprofen*-t, *S-metolachlor*-t, *tebuconazole*-t és *terbuthylazine*-t tartalmazó keverék, melyben a koncentráció növekedésével a *TRB* fokozó hatása is erősödött. Számos keverék esetében a *terbuthylazine* erősítő hatása minden effektív koncentráció szinten megnyilvánult. Az *IBU+TRB*, az *IBU+TBZ+TRB*, *CBZ+DCF+TBZ+TRB* és *DCF+IBU+TBZ+TRB* esetében a *terbuthylazine* toxicitásfokozó hatása minden hatásos szinten 60-80% körül volt.

5. táblázat Terbutylazine citotoxicitást fokozó hatása az egyes effektív koncentrációknál, melyek 10, 20, 50, 80, 90 és 95%-os biolumineszcencia gátlást indukáltak *A. fischeri* tesztorganizmusban 30 perces kontaktidő esetén. A nem toxikus terbutylazin toxicitást fokozó hatását a többi anyag százalékos szükséges koncentrációváltozásában fejeztük ki, mely ahhoz kell, hogy a TRB-t nem tartalmazó keverék toxicitása megegyezzen az azt tartalmazóéval. N.t. – nincs toxikus hatás. N.e. – nincs toxicitáserősítő hatás

A terbutylazine toxicitás-fokozó hatása (%) az egyes effektív koncentrációkon az AVF tesztben						
Keverék	EC ₁₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₈₀	EC ₉₀	EC ₉₅
1+6	-125	-29	30	n.t.	n.t.	n.t.
2+6	85	81	70	49	34	11
3+6	100	90	80	73	69	64
4+6	86	80	60	20	n.e.	n.e.
5+6	81	71	41	-18	-77	-155
1+2+6	78	67	56	45	37	27
1+3+6	85	78	58	19	-16	-63
1+4+6	14	23	26	25	24	23
1+5+6	63	44	-44	-280	-537	-975
2+3+6	56	56	48	35	24	18
2+4+6	88	81	65	35	6	-33
2+5+6	27	31	33	36	36	36
3+4+6	88	82	70	45	22	-8
3+5+6	61	58	60	61	61	61
4+5+6	-19	-16	-41	-74	-99	-129
1+2+3+6	30	18	-30	-107	-157	-237
1+2+4+6	58	46	32	13	-5	-21
1+2+5+6	78	78	75	71	68	66
1+3+4+6	69	60	44	7	-24	-63
1+3+5+6	89	78	59	23	-11	-55
1+4+5+6	97	92	51	-185	-695	-1898
2+3+4+6	72	58	49	46	41	37
2+3+5+6	84	85	82	79	77	75
2+4+5+6	64	44	25	-22	-59	-107
3+4+5+6	44	16	33	42	45	48
1+2+3+4+6	87	73	53	26	n.e.	-31
1+2+3+5+6	79	72	61	50	43	35
1+3+4+5+6	68	68	54	27	5	-20
1+2+4+5+6	73	66	49	23	2	-23
2+3+4+5+6	15	36	53	63	69	72
1+2+3+4+5+6	83	70	56	31	8	-18

4.4. ZETA teszt eredményei zebradánió (*Danio rerio*) embrón

A carbamazepne, diclofenac, ibuprofen, S-metolachlor, tebuconazole, terbuthylazine és vizsgált kombinációik hatását *Danio rerio* tesztorganizmen a 6. táblázat foglalja össze. A gyógyszer és peszticidhatóanyagok vizsgált koncentrációit a szakirodalomban fellelhető adatok alapján választottuk ki.

A vizsgált gyógyszer hatóanyagok közül a zebradánió számára a CBZ bizonyult legkevésbé toxikusnak, míg a legtoxikusabb a DCF volt, melyet az IBU követett közel 3-4x-es koncentrációval.

A vizsgált peszticid hatóanyagok mind toxikusabbnak bizonyultak a tesztorganizmet számára, mint a CBZ, ám egyik hatása sem érte el a DCF vagy akár az IBU szintjét. A növényvédő szerek közül a legtoxikusabb a TBZ volt.

A keverékeket az *Aliivibrio fischeri* akut citotoxicitási tesztben mért eredmények, valamint az azokból számolt CI értékek és a terbuthylazine toxicitást fokozó hatásai alapján választottuk ki azokat, melyeket tovább vizsgáltunk a zebradánión. Ennek megfelelően olyan keverékeket választottunk további tesztelésre, melyek már nagyon alacsony hatásos koncentráció értékeken szinergikus kölcsönhatásokat mutattak, valamint amik esetében a legkifejezettebb volt a terbuthylazine toxicitásfokozó hatása (főként alacsony koncentrációkon).

A két komponensű keverékek között nagy eltérés mutatkozott a letális koncentrációk tekintetében. A legkevésbé toxikus elegynek a MTC és TRB kombináció mutatkozott, még a CBZ önmagában is tízszer mérgezőbben hatott a zebradánióra. A legtoxikusabb kombinációk a DCF+IBU, illetve a DCF+MTC voltak, effektív koncentráció értékeik a DCF-hez hasonlítható.

A három hatóanyagot tartalmazó kombinációk közül a legalacsonyabb LC₁₀ LC₂₀ és LC₅₀ értéket a DCF+IBU+TRB elegy adta, ám LC₈₀ és LC₉₅ esetében a DCF+MTC+TRB és a DCF+TBZ+TRB (közel azonos értékekkel) bizonyult toxikusabbnak. A legkevésbé toxikus kombináció a CBZ+IBU+MTC volt.

A négy komponensű és az egy darab öt komponensű keverékek közül a DCF+IBU+TBZ+TRB volt a legtoxikusabb (LC₅₀=7,5 mg/L).

A legkevésbé potens keverék a *MTC+TRB* volt. Ezt az egy keveréket leszámítva mindegyik mix toxikusabb volt a *CBZ*-nél, ám egyik sem bizonyult, olyan mérgezőnek a tesztszervezet számára, mint a *DCF* önmagában. A legtoxikusabb keverékek a *DCF+IBU*, *DCF+MTC*, *DCF+IBU+TRB*, illetve *DCF+IBU+MTC+TRB* voltak, melyek mind alacsonyabb koncentrációban okoztak azonos mortalitást, mint a gyógyszer és peszticid hatóanyagok a *DCF*-et leszámítva.

6. táblázat A ZETA teszt során vizsgált peszticid és gyógyszer hatóanyag és kombinációik, melyek carbamazepine-t (1), diclofenac-ot (2), ibuprofen-t (3), S-metolachlor-t (4), tebuconazol-t (5) és terbuthylazine-t (6) tartalmaztak, melyek 10, 20, 50, 80, 95%-os mortalitást okoztak a zebradánio embriókban 120 óra alatt.

	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₈₀	LC ₉₅
Keverék	mg/L				
1	96,0	103,8	118,5	135,3	157,2
2	2,3	2,5	2,9	3,3	3,9
3	9,4	9,7	10,1	10,6	11,1
4	33,4	35,0	38,1	41,4	45,5
5	13,5	14,7	16,9	19,4	22,7
6	19,2	27,4	50,2	92,1	182,1
1+4	34,3	38,6	47,1	57,6	72,2
1+6	53,9	56,2	60,5	65,0	70,6
2+3	3,6	3,7	3,9	4,0	4,2
2+4	3,7	3,8	3,9	4,1	4,3
2+6	6,7	6,7	6,7	6,7	6,8
3+4	17,2	23,6	40,3	68,9	126,0
3+6	16,0	16,7	18,0	19,4	21,1
4+5	8,5	9,8	12,4	15,8	20,6
4+6	248,0	330,5	540,4	882,2	1531,8
5+6	22,9	23,2	23,8	24,4	25,0
1+3+4	17,0	21,6	32,7	49,3	78,2
2+3+4	6,8	7,0	7,3	7,6	7,9
2+3+6	4,0	4,6	5,9	7,4	9,7
2+4+5	6,8	7,0	7,4	7,8	8,2
2+4+6	6,2	6,4	6,8	7,2	7,8
2+5+6	6,5	6,7	6,9	7,2	7,5
3+4+5	14,0	15,1	17,3	19,8	23,1
2+3+4+6	4,3	5,0	6,4	8,3	11,0
2+3+5+6	6,7	7,0	7,5	8,0	8,6
3+4+5+6	15,2	16,1	17,7	19,6	21,8
2+3+4+5+6	9,0	10,2	12,5	15,4	19,4

4.5. Kombinációs Index (CI) értékek az ZETA tesztben mért hatásos koncentrációk alapján

A ZETA tesztből származó LC értékeket az *A. fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt értékekhez hasonlóan dolgoztam fel, és számoltam kombinációs indexeket CompuSyn program segítségével, mely értékeket a 7. táblázatban összegeztem.

7. táblázat A carbamazepine-t (1), diclofenac-ot (2), ibuprofen-t (3), S-metolachlor-t (4), tebuconazole-t (5) és terbuthylazine-t (6) tartalmazó keverékek *Danio rerio* testszervezetben ZETA teszt során 10, 20, 50, 80, 90 és 95%-os mortalitást okozó hatásos koncentrációinál megfigyelhető Kombinációs Index (CI) értékek. Szinergista hatás: $CI < 1$ (félkövér), additív hatás: $0.9 < CI < 1.1$ (dőlt), antagonista hatás: $CI > 1,1$

CI értékek az egyes hatásos koncentráció értékeken ZETA tesztben

Keverék	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₈₀	LC ₉₅
1+4	0.69264	0.73619	0.81736	0.90789	1.02217
1+6	1.68398	1.29781	0.85645	0.59318	0.41819
2+3	0.96665	0.92578	0.86082	0.80158	0.74120
2+4	0.84601	0.80156	0.73102	0.66680	0.60145
2+6	1.59711	1.44075	1.22391	1.05187	0.89463
3+4	1.17157	1.55520	2.52455	4.09916	7.07028
3+6	1.26357	1.16827	1.07037	1.02518	1.01079
4+5	0.44290	0.47358	0.53130	0.59647	0.67985
4+6	10.1787	10.7551	12.4660	15.4386	21.0339
5+6	1.44240	1.21446	0.94040	0.75863	0.61842
1+3+4	0.83114	1.02187	1.45550	2.07445	3.09158
2+3+4	1.27457	1.22140	1.13682	1.05960	0.98078
2+3+6	0.78447	0.82301	0.90464	1.00584	1.14377
2+4+5	1.20833	1.15125	1.05998	0.97610	0.88990
2+4+6	1.05223	0.98411	0.88886	0.81189	0.74036
2+5+6	1.20369	1.11058	0.97883	0.87144	0.77061
3+4+5	0.97843	1.00889	1.06477	1.12583	1.20124
2+3+4+6	0.66651	0.70634	0.78952	0.89226	1.03294
2+3+5+6	1.10187	1.04906	0.97539	0.91619	0.86103
3+4+5+6	0.99539	0.95148	0.90629	0.88625	0.88237
2+3+4+5+6	1.24385	1.28565	1.37514	1.48538	1.63220

Antagonista, additív és szinergista kölcsönhatásokat is sikerült megfigyelni a kísérletek eredményeiben. A *DCF+MTC*, illetve *TBZ+TRB*-t tartalmazó keverékek esetében minden koncentrációnál szinergizmust figyelhettünk meg, az utóbbinál a koncentráció növelésével csökkent a szinergizmus, előbbi esetében, viszont a koncentráció növekedésével erősödött a kölcsönhatás. Kiemelendő tovább, hogy a *DCF+MTC* az egyik legkisebb hatásos koncentrációkkal rendelkező keverék, mely már 3,6 mg/L-es expozíciónál 10%-os mortalitást okozott. A legerősebb szinergizmus LC_{10} , LC_{20} és LC_{50} -nél is a *TBZ+TRB* kombináció adta. Továbbá a *DCF+IBU+MTC+TRB* kombináció 95%-os mortalitást okozó koncentrációját kivéve, szintén szinergizmust mutatott, ami a koncentráció növekedésével gyengült. Tekintettel arra, hogy a *terbuthylazine*-t nem tartalmazó *DCF+IBU+MTC* keveréknél csak magas koncentrációkon ($LC_{80,95}$) figyelhető meg additív hatás, ezen kívül csak antagonizmus, levonható az a következtetés, hogy a 4 tagú keverékben a *terbuthylazine* játszik jelentős szerepet a szinergia kialakításában.

Három elegy, az *IBU+MTC*, *MTC+TRB* és *DCF+IBU+MTC+TBZ+TRB* esetében csak antagonizmust figyelhettünk meg. Mindhárom esetben a koncentráció emelkedésével növekedett az antagonistikus hatás erőssége.

A legerősebb antagonizmust minden koncentrációra vonatkoztatva a *MTC+TRB* hatóanyagokat tartalmazó elegynél figyelhettük meg.

4.6. ZETA tesztben megfigyelt szubletális tünetek

A mortalitás mellett szubletális tüneteket is megfigyeltünk a tesztek során. A tünetek megjelenési koncentrációit a 7. és 8. táblázat tartalmazza. Az 1. ábra tartalmazza a gyógyszer és peszticid hatóanyagok általunk megfigyelt hatásait külön-külön. Perikardiális ödémát (PÖ 2. ábra A, B), szik ödémát (SZÖ, 2. ábra A, B), szik elszíneződést (SZIK, 2. ábra A, B, C), gerinc torzulást (GT, 2. ábra A, B, C) és teljes test torzulást (TTT 2. ábra D, E) tudtunk megfigyelni a tesztszervezeteken. Teljes test torzulást abban az esetben használtuk, mikor annyira torzult az embrió, hogy nem tudtuk elkülöníteni egymástól a fenotípusos elváltozásokat.



1. ábra *Danio rerio* tesztorganizmus elváltozásai carbamazepine (CBZ), diclofenac (DCF), ibuprofen (IBU), S-metolachlor (MTC), tebuconazole (TBZ) és terbuthylazine (TRB) hatóanyagokra (Bock Illés 2021)



2. ábra *Danio rerio* tesztorganizmus jellemző szubletális tünetei. Perikardiális ödéma A és B, szik ödémát A és B, szik elszíneződést A, B és C, gerinc torzulást A, B és C és teljes test torzulást D és E (Bock Illés 2021).

A vizsgált keverékek közül a DCF+IBU, DCF+MTC, illetve DCF+TRB esetében már a legkisebb vizsgált koncentráció (3,75 mg/L keverék koncentráció, azaz 1,875 mg/L/vegyület) is teljes test torzulást idézett elő a fejlődő zebradániókban. Önmagában alkalmazva a legtoxikusabbnak tekinthető vizsgált gyógyszer hatóanyag, a DCF esetében 2,5 mg/L-es koncentrációra volt szükség, hogy ugyan ezt a tünetet előidézzék, míg az MTC és a TRB is kevésbé tekinthetőek toxikusnak, a kísérleteink során 25 mg/L-es koncentrációnál okozott (enyhébb) tüneteket.

Tünetmegjelenés szempontjából a legkevésbé toxikusnak tekinthető keverék a CBZ+TRB volt. A keveréket alkotó hatóanyagok külön-külön is alacsonyabb koncentrációban

előidéznek szubletális elváltozásokat a tesztorganizmusban. Összességében elmondható, hogy a CBZ hatóanyagból relatíve nagy koncentrációjú (a többi hatóanyaghoz viszonyítva) expozícióra van szükség, hogy toxikussá váljon a tesztorganizmus számára. Ugyanakkor érdemes megjegyeznünk a CBZ+MTC kombináció hatását, ahol az első megfigyelhető tünetek már 30 mg/L-nél jelentkeznek, míg a keveréket alkotó CBZ esetében csak 96 mg/L-es expozíciónál, az MTC esetében 25 mg/L-nél jelentkeztek szubletális tüneteket.

A hatóanyag keverékek között a DCF+IBU+TRB, DCF+IBU+MTC, DCF+MTC+TBZ, DCF+TBZ+TRB és a DCF+IBU+MTC+TRB esetében is megfigyelhettünk elváltozásokat már 3,75 mg/L-es koncentrációnál, a teljes test torzulás előidézésére 7,5 mg/L-es koncentrációra volt szükség. DCF+IBU+TRB kombináció kiemelendő, mert az említett öt elegy közül csak ennél jelent meg a fark torzulás (PÖ, SZÖ és SZIK tünetek mellett) a legkisebb vizsgált koncentrációban. A többi kombináció esetében csak perikardiális ödéma és szik elszíneződés volt megfigyelhető ebben a koncentrációban.

8. táblázat A ZETA teszt során vizsgált gyógyszer és peszticid hatóanyag kombinációk, melyek carbamazepine-t (1), diclofenac-ot (2), ibuprofen-t (3), S-metolachlor-t (4), tebuconazol-t (5) és terbuthylazine-t (6) tartalmaztak és általuk okozott szubletális tünetek 1. táblázata. PÖ perikardiális ödéma, SZÖ szik ödéma, SZIK szik elszíneződés, GT 5698gerinc-torzulás, TTT teljes test torzulás. A tünetek megjelenésének intenzitása (+ megjelent, ++++minden egyednél megfigyelhető).

	vizsgált koncentrációk mg/L					vizsgált koncentrációk mg/L					
1+4	60	30	15	7,5	3,75	1+6	60	30	15	7,5	3,75
pö		++++				pö					
szö		+				szö	++++				
szik		++++				szik					
GT		+				GT					
TTT						TTT					
2+6	60	30	15	7,5	3,75	3+4	60	30	15	7,5	3,75
pö					++++	pö		++++	++++		
szö					++++	szö			++++		
szik					++++	szik		++++			
GT					++++	GT		++++			
TTT						TTT					
2+3	60	30	15	7,5	3,75	2+4	60	30	15	7,5	3,75
pö						pö					+
szö						szö					
szik						szik					+
GT						GT					
TTT					++++	TTT					+++

3+6	60	30	15	7,5	3,75	4+5	60	30	15	7,5	3,75
pö						pö			++		
szö			++++			szö					
szik			++++			szik			++		
GT			+			GT					
TTT						TTT					
4+6	60	30	15	7,5	3,75	5+6	60	30	15	7,5	3,75
pö						pö			++++		
szö		++++				szö					
szik		++++				szik					
GT		++++				GT					
TTT						TTT					
2+3+6	60	30	15	7,5	3,75	2+4+5	60	30	15	7,5	3,75
pö					++++	pö					++++
szö					++++	szö					
szik					++++	szik					++++
GT					++	GT					
TTT				++++		TTT				++++	
1+3+4	60	30	15	7,5	3,75	2+3+4	60	30	15	7,5	3,75
pö		++++				pö					++++
szö			+			szö					
szik		++++				szik					++++
GT		++				GT					
TTT						TTT				++++	

9. táblázat A ZETA teszt során vizsgált gyógyszer és peszticid hatóanyag kombinációk, melyek *carbamazepine*-t (1), *diclofenac*-ot (2), *ibuprofen*-t (3), *S-metolachlor*-t (4), *tebuconazole*-t (5) és *terbuthylazine*-t (6) tartalmaztak és általuk okozott szubletális tünetek 2. táblázata. PÖ perikardiális ödéma, SZÖ szik ödéma, SZIK szik elszíneződés, GT gerincatorzulás, TTT teljes test torzulás. A tünetek megjelenésének intenzitása (+ megjelent, ++++minden egyednél megfigyelhető).

	vizsgált koncentrációk mg/L					vizsgált koncentrációk mg/L					
2+4+6	60	30	15	7,5	3,75	2+5+6	60	30	15	7,5	3,75
pö					++++	pö					++++
szö					+++	szö					+++
szik					++++	szik					++++
GT						GT					
TTT				++		TTT				+	
3+4+5	60	30	15	7,5	3,75	2+3+4+6	60	30	15	7,5	3,75
pö						pö					++++
szö						szö					
szik			++++			szik					
GT			+++			GT					
TTT						TTT				+++	

2+3+5+6	60	30	15	7,5	3,75	3+4+5+6	60	30	15	7,5	3,75
pö				+++	++++	pö			++		
szö				+++		szö					
szik				+++		szik			+++	+++	
GT				+++		GT			+++		
TTT						TTT					
2+3+4+5+6	60	30	15	7,5	3,75						
pö				++++							
szö				++							
szik				++++							
GT											
TTT			++++								
CBZ	120	100	50	25	12,5	DCF	10	5	2,5	1,25	0,625
pö		++++				pö			++++	+++	
szö						szö			++++	+	
szik						szik			++++	+	
GT		+				GT			++++	+	
TTT						TTT			++++		
IBU	100	50	25	12,5	6,25	MTC	200	100	50	25	12,5
pö	++					pö				++++	
szö						szö					
szik						szik				++++	
GT						GT				++++	
TTT						TTT					
TBZ	120	60	30	15	7,5	TRB	200	100	50	25	12,5
pö				++++	+++	pö			++++	++++	
szö				++++	+++	szö			++++		
szik						szik					
GT				++++		GT			++++		
TTT						TTT					

5. Következtetések javaslatok

A gyógyszer és peszticid hatóanyagok toxikológiai hatásait ismertnek tekintjük, ám átfogó ökotoxikológiai tanulmány nem áll rendelkezésre minden hatóanyagról, különösen nem a keverékeikről. Gyógyszer- és peszticid hatóanyagokat tartalmazó keverékekről igen kevés az ismeretünk. Kevés publikáció foglalkozik hatóanyagok együttes hatásával, még kevesebb témája eltérő anyagcsoportokba tartozó vegyületek (mint gyógyszer és peszticid) kombinált mechanizmusa, illetve a dolgozat megírása közben nem sikerült fellelni olyan forrást, mely eltérő anyagcsoportba tartozó vegyületek binárisnál nagyobb elemszámú keverékeivel foglalkoztak. Ezért kiemelt fontosságú, hogy legalább a környezeti elemekben leggyakrabban detektálhatóakról szerezzünk ismereteket és azok függvényében alakítsuk felhasználási, kezelési szabályozásukat.

A kutatási munka során több szinergista kölcsönhatást is megfigyelhettünk, több esetben, mint a *carbamazepine* és *S-metolachlor* kombináció, az *S-metolachlor* és *tebuconazole* keverék, a *diclofenac* *S-metolachlor* elegy, illetve a *diclofenac* *ibuprofen* koktél, melyek alkotó elemei erősítették a toxikus hatást mindkét tesztszervezetre nézve. Igaz ez a megállapítás a *carbamazepine*-t, *ibuprofen*-t és *S-metolachlor*-t tartalmazó keverékekre is. A legtoxikusabb keverékek mindkét tesztszervezetre nézve (EC_{10} és LC_{10} értékeket alapján) a *DCF+IBU* (2 és 3,6 mg/L), *DCF+IBU+TRB* (2 és 4 mg/L) és *DCF+IBU+MTC+TRB* (2 és 4,3 mg/L) voltak. Az *AVF* esetében a négytagú *CBZ+IBU+MTC+TRB* keverék már 1 mg/L össz koncentrációnál 10%-os fénykibocsátás csökkenést okozott. *DCF* és *IBU* esetében ezeket a koncentrációkat már környezeti elemekben (Ashfaq et al. 2017), illetve kibocsátott szennyvízben is kimutatták (Dusi et al. 2019).

További aggodalomra adhat okot, hogy a *terbuthylazine*, mely önmagában a vizsgált koncentrációkban nem volt toxikus az *A. fischeri*-re, kombinálva egyéb hatóanyagokkal fokozta azok citotoxikus hatását, a ZETA eredményei alapján olyan keverék esetében is szinergia megjelenését okozhatja, ami a TRB nélkül csupán additív vagy antagonistá hatású (*DCF+IBU+MTC* kombináció ZETA teszt esetében). Az Európai Unió 2004-ben betiltotta az *atrazine* használatát tagállamaiban, mezőgazdaságilag jelentős szerepe miatt 2007-ig használták egyes országokban, Magyarországon is. 2007-től *terbuthylazine*-nal helyettesítik, Magyarországon a NÉBIH éves szerforgalmi jelentése alapján 2019-ben a 4. legnagyobb mennyiségben forgalmazott hatóanyagként 309 589 kg került forgalomba a szerből (<http26>). A többi vizsgált hatóanyagra gyakorolt erősítő hatása az *AVF* kísérletekben, jelenlétében

megjelenő szinergizmus a ZETA tesztekben, továbbá E2 (17 β)-ösztro-1,3,5(10)-trién-3,17-diol) hormonhatásának erősítése is (Kjeldsen et al. 2013), aggodalomra adhat okot.

Igaz kisebb koncentrációkban, ám gyakorlatilag szinte állandó az ökoszisztéma összes elemének kitettsége ezeknek a vegyületeknek. A vizsgált gyógyszer és peszticid hatóanyagok talajban, talajvízben sokáig perzisztálhatnak, illetve folyamatos utánpótlásuk garantált, mivel mindegyikből igen nagy mennyiséget használ fel a társadalom, így környezeti elemekbe való kijutásuk gyakorlatilag megakadályozhatatlan. Hosszú távú kombinált hatásaiak pedig még nem tisztázottak. Megfigyelhető kísérleteink eredményeiben, hogy egyes kombinációk toxikusabbaknak bizonyultak a *Danio rerio* tesztszervezetre, mint az *A. fischeri*-re. Ilyen kombinációk voltak a DCF+MTC ($EC_{10, AVF}$ = 10 mg/L, $LC_{10, ZETA}$ = 3,7 mg/L), MTC+TBZ ($EC_{10, AVF}$ = 12 mg/L, $LC_{10, ZETA}$ = 8,5 mg/L) és DCF+IBU+MTC+TBZ+TRB ($EC_{10, AVF}$ = 8 mg/L, $LC_{10, ZETA}$ = 6,7 mg/L). Ennek a jelenségnek magyarázata lehet, hogy az AVF akut 30 perces, míg a ZETA 120 órás expozíciós időt alkalmaz, ugyanakkor a prokarióta, illetve gerinces tesztszervezetet alkalmazó két teszt eredménye közvetlenül nem állítható egymással párhuzamba. Ezért javaslom hosszított expozíciós idejű krónikus tesztek alkalmazását, többek között a meghosszabbított kontaktidejű AVF tesztet, a jövőbeli vizsgálatokhoz. A hatóanyag kombinációk ökotoxikológiai vizsgálatainak folytatása, a tesztszervezetek körének kibővítésével is kiemelkedően fontos. Pontos környezeti kockázatbecslések létrehozásához szükséges eltérő taxonómiai csoportba tartozó, különböző trofítási szinten lévő, eltérő felépítésű, eltérő életformát folytató tesztszervezetekkel történő ökotoxikológiai teszteredmények megléte. A környezeti kockázatbecslések árnyaltabbak, pontosabbak lehetnek így a jövőben. Továbbá az ökoszisztéma érzékenységét a legérzékenyebb összetevője határozza meg, ezért szintén fontos, hogy a tesztszervezetek körét diverzifikáljuk. A tesztszervezetek közé érdemes lenne bevonni egysejtes gombákat, algákat, magasabb rendű növényeket, mint a széles körben alkalmazott apró békalencsét, ízeltlábúakat, mint *Daphnia* sp., továbbá egyéb vízi állatokat, puhatestűeket, illetve egyéb halfajokat. A szinergiát kis koncentrációban is mutató keverékek esetében, mint DCF+IBU+MTC vagy DCF+IBU+MTC+TRB a hatóanyagok hatásmechanizmusának és interakcióinak molekuláris szintű vizsgálatait is érdemes megfontolni.

6. Összefoglalás

Az emberiség által alkalmazott xenobiotikumok multikomponens-keverékként vannak jelen a környezetben, együttes ökotoxikológiai hatásairól azonban még nem rendelkezünk elegendő ismerettel. A környezetbe jutó xenobiotikumok két igen jelentős csoportját a gyógyszer- és peszticid hatóanyagok jelentik. Kutatási munkám célkitűzése volt a környezeti elemekben gyakran detektálható három gyógyszer- (*carbamazepine* - CBZ, *diclofenac* - DCF és *ibuprofen* - IBP) és három peszticid hatóanyag (*S-metolachlor* – MTC, *tebuconazole* – TBZ és *terbuthylazine* - TRB) együttes biológiai hatásának vizsgálata ökotoxikológiai tesztekkel, továbbá a vegyületek között jelentkező szinergista, additív és antagonisták kölcsönhatások megállapítása. Az alkalmazott ökotoxikológiai tesztek kiválasztása során szempont volt, hogy a tesztszervezetek eltérő trofítási szinteket képviseljenek, így komplexebb képet kaphassunk a vizsgált keverékek biológiai aktivitásáról.

A hazai és külföldi szakirodalom feldolgozása során átfogó képet kaptam a vizsgált hatóanyagokról. Dolgozatomban bemutatom felhasználásukat, nem célszervezetekre gyakorolt hatásukat, környezeti elemekbe való kijutásuk útját, környezeti sorsukat, degradációjukat.

A vizsgálatokba bevont mikroszennyező anyagok citotoxikus hatását külön-külön és minden lehetséges, 2-től 6 komponenst tartalmazó 57 kombinációját megvizsgáltam *Aliivibrio fischeri* (AVF) szabványos akut, 30 perces kontakt idejű biolumineszcencia gátlási teszttel. Az AVF tesztekben legkifejezettebb szinergiát és toxicitást mutató 21 kombinációt az alternatív gerinces tesztszervezeten, a *Danio rerio*-n alapuló módszerrel, a *zebrafish embryo toxicity assay*-vel (ZETA) is megvizsgáltam. A ZETA tesztekben 5 napos expozíciót követően mortalitás mellett szubletális tüneteket is megállapítottam, mint perikardiális ödéma, sziködéma, szik elszíneződés, gerinctorzulás (azokban az esetekben, melyekben a szubletális tünetek már nem voltak elkülöníthetőek teljes test torzulást állapítottam meg). A vizsgált hatóanyagok együttes toxikológiai hatásait Kombinációs Index módszerrel, CompuSyn program segítségével vizsgáltam.

A keverékek AVF teszttel történő vizsgálata során 19 keverék esetében írhattunk le szinergizmust, ezek közül 8 esetben már a legkisebb megfigyelt 10%-os hatásos koncentrációban (2-12 mg/L) szinergia volt mérhető. A *terbuthylazine* önmagában nem volt toxikus az *A. fischeri* tesztszervezetre, ezért vizsgált elegyei esetében nem állapíthattunk meg szinergizmust, additív vagy antagonisták kölcsönhatást, ezekben az esetekben egyedi toxicitás-erősítő hatásról beszélhetünk, melyet százalékosan fejeztem ki (a vele kombinációban

szereplő vegyületek koncentrációját hány százalékkal kell növelni ahhoz, hogy a *TRB* nélkül is ugyanazt a hatást eredményezzék, mint *TRB* jelenlétében). A *terbuthylazine* két eset kivételével mindegyik keverékben 10%-os effektív koncentrációig, illetve három eset kivételével 50%-os effektív koncentrációig fokozta a keverékekben jelen lévő hatóanyag(ok) toxicitását. A *ZETA* tesztek esetében önmagában vizsgálva a *diclofenac* volt a legtoxikusabb, 10%-os effektív hatást már 2,3 mg/L-es koncentrációnál elért. 15 kombinációnál figyelhattunk meg szinergizmust, ezek közül 6 esetben már 10%-os hatásos szinten, ami *DCF+MTC*, *DCF+IBU+TRB* és *DCF+IBU+MTC+TRB* kombinációk esetén 3,7, 4, illetve 4,3 mg/L koncentrációt jelentett.

A továbbiakban javaslom a vizsgált gyógyszer- és peszticid hatóanyagok és keverékeik vizsgálatainak folytatását krónikus tesztekkel a hosszú távú hatásaik felderítése érdekében. Javaslom továbbá a tesztsszervezetek körének bővítését eltérő trofítási szintekhez tartozó, minél több és diverzebb életmódú és taxonómiai csoportba tartozó tesztsszervezettel. Az így nyert eredmények hozzájárulhatnak a környezeti elemekben gyakran detektálható mikroszennyező keverékek pontosabb környezeti kockázatbecslésekhez.

7. Irodalomjegyzék

1. Amacker, N., Mitchell, E.A.D., Ferrari, Benoît.J.D., Chèvre, N., Development of a new ecotoxicological assay using the testate amoeba *Euglypha rotunda* (Rhizaria; Euglyphida) and assessment of the impact of the herbicide S-metolachlor, *Chemosphere* (2018), doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.001.
2. Ana-Belén Muñoz-González, Ibuprofen as an emerging pollutant on non-target aquatic invertebrates: Effects on *Chironomus riparius*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 81, 2021, 103537, ISSN 1382-6689, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103537>.
3. Ashfaq, M., Nawaz Khan, K., Saif Ur Rehman, M., Mustafa, G., Faizan Nazar, M., Sun, Q., ... Yu, C.-P. (2017). Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 31–39. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.029
4. Baćmaga, M., Wyszowska, J., & Kucharski, J. (2019). Biostimulation as a process aiding tebuconazole degradation in soil. *Journal of Soils and Sediments*. doi:10.1007/s11368-019-02325-3
5. Balciunas, E. M., Kappelmeyer, U., Harms, H., & Heipieper, H. J. (2020). Increasing ibuprofen degradation in constructed wetlands by bioaugmentation with gravel containing biofilms of an ibuprofen-degrading *Sphingobium yanoikuyae*. *Engineering in Life Sciences*. doi:10.1002/elsc.201900097
6. Barra Caracciolo, A., Fajardo, C., Grenni, P., Saccà, M. L., Amalfitano, S., Ciccoli, R., ... Gibello, A. (2010). The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbutylazine. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1), 127–136. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00787.x
7. Belden, J. B., Gilliom, R. J., & Lydy, M. J. (2007). How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3), 364–372. doi:10.1002/ieam.5630030307
8. Bernardes, P. M., Andrade-Vieira, L. F., Aragão, F. B., Ferreira, A., & da Silva Ferreira, M. F. (2015). Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(7). doi:10.1007/s11270-015-2462-y
9. Berry, J. P., Gantar, M., Gibbs, P. D. L., & Schmale, M. C. (2007). The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(1), 61–72. doi:10.1016/j.cbpc.2006.07.011
10. Bose, J. L., Kim, U., Bartkowski, W., Gunsalus, R. P., Overley, A. M., Lyell, N. L., ... Stabb, E. V. (2007). Bioluminescence in *Vibrio fischeri* is controlled by the redox-responsive regulator ArcA. *Molecular Microbiology*, 65(2), 538–553. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05809.x
11. Brezina, E., Prasse, C., Meyer, J., Mückter, H., & Ternes, T. A. (2017). Investigation and risk evaluation of the occurrence of carbamazepine, oxcarbazepine, their human metabolites and transformation products in the urban water cycle. *Environmental Pollution*, 225, 261–269. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.106
12. Buser, H.-R., Poiger, T., & Müller, M. D. (1998). Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake. *Environmental Science & Technology*, 32(22), 3449–3456. doi:10.1021/es980301x
13. Bushra R, Aslam N: An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med J*. 2010 Jul;25(3):155-1661. doi: 10.5001/omj.2010.49.
14. Carmona, E., Andreu, V., & Picó, Y. (2014). Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of The Total Environment*, 484, 53–63. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.0

15. Cedergreen, N. (2014). Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE*, 9(5), e96580. doi:10.1371/journal.pone.0096580
16. Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*, 6(6), e04087. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04087
17. Chou TC and Martin N. *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ Values*, ComboSyn Inc, Paramus, (NJ), 2005.
18. Chou, T.-C. (2008). Preclinicalversusclinical drug combination studies. *Leukemia & Lymphoma*, 49(11), 2059–2080. doi:10.1080/10428190802353591
19. Chou, T.-C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27–55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4
20. Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3), 309–315. doi:10.1016/s0147-6513(03)00141-6
21. Du, J., Mei, C.-F., Ying, G.-G., & Xu, M.-Y. (2016). Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(1), 84–90. doi:10.1007/s00128-016-1806-7
22. Durán-Álvarez, J. C., Prado, B., González, D., Sánchez, Y., & Jiménez-Cisneros, B. (2015). Environmental fate of naproxen, carbamazepine and triclosan in wastewater, surface water and wastewater irrigated soil — Results of laboratory scale experiments. *Science of The Total Environment*, 538, 350–362. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.028
23. Dusi E., Rybicki M., Jungmann D. 2019. The database "Pharmaceuticals in the Environment" - Update and new analysis. Final report. German Environmental Agency. Umweltbundesamt, GWT-TUD GmbH. Dresden, Germany. <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen>
24. Fingler, S., Mendaš, G., Dvorščak, M., Stipičević, S., Vasilić, Ž., & Drevenkar, V. (2016). Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(12), 11017–11030. doi:10.1007/s11356-016-7074-6
25. Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P. Y., & Morin, B. (2017). Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 201–210. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.12.018
26. Gauthier, H., Yargeau, V., & Cooper, D. G. (2010). Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of The Total Environment*, 408(7), 1701–1706. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.12.012
27. Grandclément, C., Piram, A., Petit, M.-E., Seyssiecq, I., Laffont-Schwob, I., Vanot, G., ... Doumenq, P. (2020). Biological Removal and Fate Assessment of Diclofenac Using *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus laterosporus* Strains and Ecotoxicological Effects of Diclofenac and 4'-Hydroxy-diclofenac. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–12. doi:10.1155/2020/9789420
28. Hai, F., Yang, S., Asif, M., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., ... Yamamoto, K. (2018). Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. *Water*, 10(2), 107. doi:10.3390/w10020107
29. Haq, M., Gonzalez, N., Mintz, K., Jaja-Chimedza, A., De Jesus, C. L., Lydon, C., Welch, A., & Berry, J. P. (2016). Teratogenicity of Ochratoxin A and the Degradation Product, Ochratoxin α , in the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model of Vertebrate Development. *Toxins*, 8(2), 40. <https://doi.org/10.3390/toxins8020040>

30. Herrero-Hernández E., Andrades M. S., Álvarez-Martín A., Pose-Juan E., Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martín M.J. (2013). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region, *Journal of Hydrology*, 486: 234-245. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.01.025>.
31. Herrero-Hernández E., Pose-Juan E., Sánchez-Martín M.J., Andrades M.S., Rodríguez-Cruz M.S. (2016). Intra-annual trends of fungicide residues in waters from vineyard areas in La Rioja region of northern Spain. *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(22):22924-22936. <http://doi.org/10.1007/s11356-016-7497-0>. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27578090.
32. Jarvis, A. L., Bernot, M. J., & Bernot, R. J. (2014). The effects of the psychiatric drug carbamazepine on freshwater invertebrate communities and ecosystem dynamics. *Science of The Total Environment*, 496, 461–470. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.084
33. Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Göbel, A., McArdell, C. S., Ternes, T., & Siegrist, H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39(14), 3139–3152. doi:10.1016/j.watres.2005.05.031
34. Kjeldsen, L. S., Ghisari, M., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2013). Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(2), 453–464. doi:10.1016/j.taap.2013.06.028
35. Kruglova, A., Ahlgren, P., Korhonen, N., Rantanen, P., Mikola, A., & Vahala, R. (2014). Biodegradation of ibuprofen, diclofenac and carbamazepine in nitrifying activated sludge under 12°C temperature conditions. *Science of The Total Environment*, 499, 394–401. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.069
36. Kümmerer, K. (2010). Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35(1), 57–75. doi:10.1146/annurev-environ-052809-161223
37. Lamberth, C. (2016). Chloroacetamide Herbicides. *Bioactive Carboxylic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*, 293–302. doi:10.1002/9783527693931.ch21
38. Lefrancq M., Jadas-Hécart A., La Jeunesse I., Landry D., Payraudeau S. (2017). High frequency monitoring of pesticides in runoff water to improve understanding of their transport and environmental impacts. *Science of the Total Environment* 587–588, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.022>
39. Li, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Han, Y., & Zheng, Y. (2015). Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils. *Chemosphere*, 122, 145–153. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11
40. Li, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li, J., Kong, Z., ... Zheng, Y. (2011). Enantioselective determination of triazole fungicide tebuconazole in vegetables, fruits, soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35(2), 206–215. doi:10.1002/jssc.201100674
41. Lu, Z., Sun, W., Li, C., Ao, X., Yang, C., & Li, S. (2019). Bioremoval of non-steroidal anti-inflammatory drugs by *Pseudoxanthomonas* sp. DIN-3 isolated from biological activated carbon process. *Water Research*. doi:10.1016/j.watres.2019.05.065
42. Martin, O., Scholze, M., Ermler, S., McPhie, J., Bopp, S. K., Kienzler, A., ... Kortenkamp, A. (2021). Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environment International*, 146, 106206. doi:10.1016/j.envint.2020.106206
43. Masiá A., Campo J., Navarro-Ortega A., Barceló D., Picó Y. (2015). Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Science of The Total Environment* 503-504: 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.095>.
44. Milan, M., Vidotto, F., Piano, S., Negre, M., & Ferrero, A. (2013). Buffer strip effect on terbuthylazine, desethyl-terbuthylazine and S-metolachlor runoff from maize fields in Northern Italy. *Environmental Technology*, 34(1), 71–80. doi:10.1080/09593330.2012.680919

45. Miyashiro, T., & Ruby, E. G. (2012). Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 84(5), 795–806. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x
46. Munoz, A., Koskinen, W. C., Cox, L., & Sadowsky, M. J. (2011). Biodegradation and Mineralization of Metolachlor and Alachlor by *Candida xestobii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(2), 619–627. doi:10.1021/jf103508w
47. Murdoch, R. W., & Hay, A. G. (2013). Genetic and chemical characterization of ibuprofen degradation by *Sphingomonas* Ibu-2. *Microbiology*, 159(Pt_3), 621–632. doi:10.1099/mic.0.062273-0
48. Murdoch, R. W., & Hay, A. G. (2015). The biotransformation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by *Variovorax* Ibu-1. *Biodegradation*, 26(2), 105–113. doi:10.1007/s10532-015-9719-4
49. Neves, M., Castro, B. B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J. C., Coutinho, J. A. P., ... Gonçalves, A. M. M. (2015). Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S -metolachlor). *Ecological Indicators*, 53, 220–230. doi:10.1016/j.ecolind.2015.01.031
50. Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., ... Ahmed Khan, A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630–633. doi:10.1038/nature02317
51. Pannacci, Euro & Onofri, Andrea. (2016). Alternatives to terbuthylazine for chemical weed control in maize. *Communications in Biometry and Crop Science*. 11. 51-63.
52. Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00299
53. Pinto, A. P., Serrano, C., Pires, T., Mestrinho, E., Dias, L., Teixeira, D. M., & Caldeira, A. T. (2012). Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of The Total Environment*, 435-436, 402–410. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.07.0027
54. Plhalova L, Stepanova S, Blahova J, Praskova E, Hostovsky M, Skoric M, Zelnickova L, Svobodova Z, Bedanova I. The effects of subchronic exposure to terbuthylazine on zebrafish. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33 Suppl 3:113-9. PMID: 23353853.
55. Poiger, T., Müller, M. D., & Buser, H.-R. (2002). Verifying the Chiral Switch of the Pesticide Metolachlor on the Basis of the Enantiomer Composition of Environmental Residues. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 56(6), 300–303. doi:10.2533/000942902777680388
56. Quintaneiro, C., Patrício, D., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2017). Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. *Science of The Total Environment*, 586, 390–400. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.153
57. Quintaneiro, C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2018). Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere*, 194, 595–601. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.171
58. Radjenovic, J., Petrovic, M., & Barceló, D. (2006). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1365–1377. doi:10.1007/s00216-006-0883-6
59. Richardson, S. D. (2009). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 81(12), 4645–4677. doi:10.1021/ac9008012
60. Rodríguez-Rodríguez, C. E., Marco-Urrea, E., & Caminal, G. (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology*, 101(7), 2259–2266. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.089

61. Rutere, C., Knoop, K., Posselt, M., Ho, A., & Horn, M. A. (2020). Ibuprofen Degradation and Associated Bacterial Communities in Hyporheic Zone Sediments. *Microorganisms*, 8(8), 1245. doi:10.3390/microorganisms8081245
62. Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., & Gu, F. L. (2019). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment*, 134057. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.1340
63. Sehnem, N. T., Souza-Cruz, P., Peralba, M. D. C. R., & Ayub, M. A. Z. (2009). Biodegradation Of Tebuconazole By Bacteria Isolated From Contaminated Soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 45(1), 67–72. doi:10.1080/03601230903404499
64. Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., ... Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11). doi:10.1007/s42452-019-1485-1
65. Stancova, V., Plhalova, L., Blahova, J., Zivna, D., Bartoskova, M., Siroka, Z., ... Svobodova, Z. (2017). Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*). *Veterinární Medicína*, 62(No. 2), 90–97. doi:10.17221/125/2016-vetmed
66. Tariba Lovaković, B., Pizent, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Micek, V., Mendaš, G., ... Želježić, D. (2017). Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 93–103. doi:10.1016/j.fct.2017.07.046
67. Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H. R., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-Disrupting Activities In Vivo of the Fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole. *Toxicological Sciences*, 100(2), 464–473. doi:10.1093/toxsci/kfm227
68. Thakkar, M., Randhawa, V., & Wei, L. (2013). Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquatic Toxicology*, 126, 198–206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
69. Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., & Müller, S. R. (2003). Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, 37(6), 1061–1068. doi:10.1021/es025834r
70. Trebst, A. (2008) The mode of action of triazine herbicides in plants. In: LeBaron H.M. et al. (eds) *The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. Elsevier
71. Trombini, C., Hampel, M., & Blasco, J. (2019). Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: an integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology*. doi:10.1016/j.aquatox.2019.01.004
72. Van Wijk, R. C., Krekels, E. H. J., Hankemeier, T., Spalink, H. P., & van der Graaf, P. H. (2016). Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 22, 27–34. doi:10.1016/j.ddmod.2017.04.003
73. Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., & Kouba, A. (2017). Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Chemosphere*, 175, 440–445. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.080
74. Wang, Z., Zhang, J., Hu, B., Yu, J., Wang, J., & Guo, X. (2018). Graphene/Fe₃O₄ nanocomposite for effective removal of ten triazole fungicides from water solution: Tebuconazole as an example for investigation of the adsorption mechanism by experimental and molecular docking study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. doi:10.1016/j.jtice.2018.09.026

75. Watt, M. S., Wang, H., Rolando, C. A., Zaayman, M., & Martin, K. (2010). Adsorption of the herbicide terbuthylazine across a range of New Zealand forestry soils. *Canadian Journal of Forest Research*, 40(7), 1448–1457. doi:10.1139/x10-082
76. Xiong, J.-Q., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M.-K., Choi, J., Kim, J. O., & Jeon, B.-H. (2016). Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresource Technology*, 205, 183–190. doi:10.1016/j.biortech.2016.01.038
77. Yang, G., Chen, C., Wang, Y., Peng, Q., Zhao, H., Guo, D., ... Qian, Y. (2017). Mixture toxicity of four commonly used pesticides at different effect levels to the epigeic earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 29–39. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.03.037
78. Želježić, D., Žunec, S., Bjeliš, M., Benković, V., Mladinić, M., Lovaković Tariba, B., ... Kopjar, N. (2018). Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbuthylazine on DNA integrity in human and mouse cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 19065–19081. doi:10.1007/s11356-018-2046-7
79. Želonková, K., Havadej, S., Verebová, V., Holečková, B., Uličný, J., & Staničová, J. (2019). Fungicide Tebuconazole Influences the Structure of Human Serum Albumin Molecule. *Molecules*, 24(17), 3190. doi:10.3390/molecules24173190
80. Zemolin, C. R., Avila, L. A., Cassol, G. V., Massey, J. H., & Camargo, E. R. (2014). Environmental fate of S-Metolachlor: a review. *Planta Daninha*, 32(3), 655–664. doi:10.1590/s0100-83582014000300022
81. Zhan, X., Liu, H., Miao, Y., & Liu, W. (2006). A comparative study of rac- and S-metolachlor on some activities and metabolism of silkworm, *Bombyx mori* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(3), 133–138. doi:10.1016/j.pestbp.2005.12.003

Internetes hivatkozások

- http1 <https://envirotoxdatabase.org/> Megtekintés ideje 2021.07.14
- http2 <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/carbamazepine> Megtekintés ideje 2021.07.14
- http3 <https://hu.wikipedia.org/wiki/Diklofen%C3%A1k> Megtekintés ideje 2021.07.14
- http4 <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/diclofenac%20sodium> Megtekintés ideje 2021.07.14
- http5 <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/ibuprofen> Megtekintés ideje 2021.07.14
- http6 <https://hu.wikipedia.org/wiki/Ibuprof%C3%A9n> Megtekintés ideje 2021.07.14
- http7 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/S-Metolachlor> Megtekintés ideje 2021.07.16
- http8 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22206#section=Names-and-Identifiers> Megtekintés ideje 2021.07.16
- http9 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86102#section=3D-Conformer> Megtekintés ideje 2021.07.16
- http10 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2554> Megtekintés ideje 2021.07.16
- http11 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672> Megtekintés ideje 2021.07.16
- http12 <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1027.htm> Megtekintés ideje 2021.07.16
- http13 <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/623.htm> Megtekintés ideje 2021.07.19

http14 <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/610.htm> Megtekintés ideje 2021.07.19

http15 <https://hu.wikipedia.org/wiki/Karbamazepin> Megtekintés ideje 2021.07.19

http16 <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:3387> Megtekintés ideje 2021.07.19

http17 <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=7a1e523a-b377-43dc-b231-7591c4c888ea> Megtekintés ideje 2021.07.19

http18 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5018304> Megtekintés ideje 2021.07.19

http19 https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47984 Megtekintés ideje 2021.08.15

http20 <https://www1.racgp.org.au/ajgp/2018/november/principles-of-cancer-pain-management> Megtekintés ideje 2021.08.15

http21 https://en.wikipedia.org/wiki/Diclofenac#Medical_uses Megtekintés ideje 2021.08.15

http22 <https://www.nhs.uk/medicines/carbamazepine/> Megtekintés ideje 2021.08.15

http23 <https://www.nhs.uk/medicines/diclofenac/> Megtekintés ideje 2021.08.15

http24 <https://www.nhs.uk/medicines/ibuprofen-for-adults/> Megtekintés ideje 2021.08.15

http25 <https://www.drugs.com/drug-interactions/diclofenac-with-famotidine-ibuprofen-869-0-3320-0.html> Megtekintés ideje 2021.08.15

http26 https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/367102/2019_Szerforg.pdf/3c6ebe71-0681-7eb7-63f5-b7cf465a9bb8?t=1608646209668 Megtekintés ideje 2021.09.10

http27 <https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/kereso> Megtekintés ideje 2021.09.10

http28 <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-507> Megtekintés ideje 2021.09.10

http29 <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/global-medicine-spending-and-usage-trends-outlook-to-2025> Megtekintés ideje 2021.09.10

http30 <https://hu.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Carbamazepine.svg> Megtekintés ideje 2021.09.10

http31 <https://hu.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Diclofenac.png> Megtekintés ideje 2021.09.10

http32 [https://en.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen#/media/File:\(RS\)-Ibuprofen_Structural_Formula_V1.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen#/media/File:(RS)-Ibuprofen_Structural_Formula_V1.svg) Megtekintés ideje 2021.09.10

http33 https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a7/Metolachlor_four_stereoisomers_V.1.svg/800px-Metolachlor_four_stereoisomers_V.1.svg.png Megtekintés ideje 2021.10.05

http34 <https://en.wikipedia.org/wiki/Tebuconazole#/media/File:Tebuconazole.svg> Megtekintés ideje 2021.10.05

http35 <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/75/Terbuthylazine.png/220px-Terbuthylazine.png> Megtekintés ideje 2021.10.05

http36 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:52012DC0252&from=HU>
Megtekintés ideje 2021.10.05

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálás köszönetem témavezetőimnek Dr. Háhn Juditnak, hogy idejét, energiáját és türelmét nem kímélve odaadóan segített munkám minden területén és hálás köszönettel tartozom Bock Illésnek oktatásomba fektetett idejéért és energiájáért.

Köszönettel tartozom az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársainak a vizsgálatokban és kísérletekben nyújtott segítségért.

A kutatómunkát az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatta a Térmaterületi Kiválósági Program 2020, Nemzeti Kihívások Alprogram (TKP2020-NKA-16) és a 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00239 projektek támogatásával. A kutatás Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-4-II és ÚNKP-21-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.”

készült.”



MATE AKI TDK 2021.

KÖRNYEZETI ELEMKBŐL GYAKRAN DETEKTÁLHATÓ GYÓGYSZER- ÉS PESZTICID HATÓANYAGOK KOKTÉLHATÁSÁNAK ÖKOTOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Ecotoxicological assessment of cocktail effect of pharmaceuticals and pesticides frequently detected in the environment

Készítette: **Göbölös Balázs**, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológiai intézet, Gödöllő, Mezőgazdasági biotechnológus Msc 2. évfolyam

Témavezető: **Dr. Háhn Judit**, tudományos munkatárs, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezetbiztonsági Tanszék
Bock Illés, kutatási asszisztens, PhD hallgató, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezettoxikológia Tanszék

A xenobiotikumok multikomponens-keverékeként vannak jelen a környezetben, azonban a vegyületmixek ökotoxikológiai hatásairól még közel sem elegendők az ismereteink. Az utóbbi másfél évtized alatt több, mint 1000 különböző keverék toxikológiai, ökotoxikológiai vizsgálata történt meg, ezek kétharmada azonban 2 komponensnél többet nem foglalt magába. Kutatási munkám célkitűzése a környezeti elemekben gyakran detektálható három gyógyszer- (*carbamazepine* - *CBZ*, *diclofenac* - *DCF*, *ibuprofen* - *IBU*) és három peszticid hatóanyag (*S-metolachlor* - *MTC*, *tebuconazol* - *TBZ*, *terbuthylazine* - *TRB*) együttes biológiai hatásainak ökotoxikológiai tesztekkel történő vizsgálata, valamint a vizsgálatok során nyert adatok segítségével a vegyületek között jelentkező szinergista, additív és antagonisták kölcsönhatások megállapítása volt. Az ökotoxikológiai tesztek kiválasztása során szempont volt, hogy eltérő trofítási szinteket képviseljenek a tesztorganizmusok.

A szabványos akut, 30 perces kontaktidejű *Aliivibrio fischeri* (*AVF*) biolumineszcencia gátlási teszttel megvizsgáltam a hatóanyagok és minden lehetséges (2-től 6 komponens tartalmazó) kombinációjuk citotoxicitását. Az *AVF* tesztben szinergiát, toxicitás-erősítést mutató keverékeket a továbbiakban az alternatív gerinces ökotoxikológiai tesztorganizmet, a *Danio rerio*-t (zebradánió) alkalmazó *zebrafish embryo toxicity assay*-vel (*ZETA* teszt) szintén vizsgáltam, mely során 5 napos expozíciót követően a mortalitást és szubletális tüneteket (perikardiális ödéma, sziködéma, szik elszíneződés, gerinctorzulás) állapítottam meg. Az vizsgált hatóanyagok együttes toxikológiai hatását Kombinációs Index módszerrel, CompuSyn program segítségével vizsgáltam.

Az *AVF* teszt során 19 keverék esetben volt szinergizmus megfigyelhető. Ezek közül 8 esetben már a 10%-os hatásos koncentráción (2-12 mg/L) szinergia volt mérhető. A *TRB* önmagában nem volt toxikus, ezért az ezt tartalmazó keverékek esetében egyedi toxicitás-erősítő hatásról beszélhetünk, melyet %-ban fejeztem ki. 3 keverék kivételével az 50%-os hatásos koncentrációig a *TRB* minden esetben növelte a vele keverékben szereplő vegyület(ek) toxicitását. A *ZETA* tesztek alapján önmagában a diclofenac volt a legtoxikusabb. Szinergizmust 15 kombinációnál figyelhattunk meg, ezek közül 6 esetben már 10%-os hatásos szinten, ami a *DCF+MTC*, *DCF+IBU+TRB* és *DCF+IBU+MTC+TRB* esetében mindössze 3,7, 4, illetve 4,3 mg/L koncentrációt jelentett.

A továbbiakban a vizsgált gyógyszer- és peszticid hatóanyagok és keverékeik vizsgálatainak folytatását javaslom krónikus tesztekkel és más trofítási szintet képviselő szervezetekkel. Az így nyert eredmények hozzájárulhatnak a gyakran detektálható mikroszennyező keverékek pontosabb környezeti kockázatbecsléséhez.