



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Ökotoxikológiai módszerek vízi tesztorganizmusokkal

Környezettoxikológia
Laboratóriumi gyakorlat

Elméleti bevezetés

2013

Szerzők:

Molnár Mónika, Kunlgné Nagy Zsuzsanna, Hajdu Csilla, Fekete-Kertész Ildikó

1. Bevezetés

Az ökotoxikológiai tesztek két fő szempontból csoportosíthatjuk:

- Tesztelés **időtartalma**
- Tesztorganizmus **faja** illetve a tesztrendszer **fajösszetétele**

A tesztelés időtartalma alapján megkülönböztetjük az **akut** (rövid időtartam) és a **krónikus** (hosszabb időtartam) tesztek. Az akut tesztekben alkalmazott tesztorganizmusok esetében a tesztelési idő (24, 48 illetve 72 óra) alatt nem jellemző a reprodukció. A krónikus tesztek időtartama a tesztorganizmus életidejétől illetve reprodukciós ciklusának hosszától függ. A krónikus tesztre jellemző, hogy a teszt időtartama az alkalmazott tesztorganizmus életének nagy részét magában foglalja.

A tesztrendszer fajösszetétele alapján megkülönböztetjük az **egy-** illetve a **több fajt alkalmazó** tesztek. Egy fajt alkalmazó tesztek esetében beszélhetünk továbbá **szárazföldi, vízi** és **üledéklakó** tesztorganizmusokról. A környezeti elem szerinti megkülönböztetés azért fontos, mert ettől függően az **expozíciós útvonalak** is eltérőek lehetnek. Vízi tesztek esetében akkor szimuláljuk megfelelően az **expozíciót**, ha az egész testet éri a vegyi anyag vagy a vizsgálni kívánt minta. Szárazföldi tesztek esetében is mód van olyan tesztkörülmények és tesztorganizmus kiválasztására, mely teljes testfelülettel érintkezik a talajjal (pl. földigiliszta, Collembola, stb.). Az üledéklakók esetében még összetettebb expozíciós útvonalak létezhetnek az üledékkal való közvetlen érintkezés következtében.

A tesztorganizmusok helyes megválasztása az ökotoxikológiai tesztek kritikus pontja. A **tesztorganizmusoknak meg kell felelnie** a következő **követelményeknek**:

- Könnyen hozzáférhető faj legyen
- Laboratóriumi körülmények között fenntartható és tenyészthető legyen
- A tenyészet története és genetikája ismert legyen
- Érzékeny legyen több típusú vegyi anyagra
- Jól mérhető végponttal rendelkezzen és reprodukálható eredményt adjon
- Ne legyen patogén
- Jól reprezentálja osztályát vagy trofikus szintjét

Az ökotoxikológiai mérés végpontja a biokémiai szinttől az organizmus és közösség szintjén keresztül az ökoszisztéma szintjéig bárhol megválasztható a cél függvényében. A mérhető végpont eredménye alapján gyakran további származtatott értékeket használunk fel a kockázat mértékének megállapításához, döntések előkészítéséhez. Meg kell különböztetnünk a **mérés végpontját**, – amely nem más, mint a tesztorganizmuson vagy más szinten *közvetlenül mért* érték –, és a teszt számításal származtatott **vizsgálati végpontját**. Gyakori mérési végpont a stresszfehérjék megjelenése, enzimek aktivitása, fénykibocsátás, mozgásképtelenség, halál, stb. A mérési végpontokból származtatott eredmény *többletinformációt szolgáltat*, pl. fénykibocsátásból relatív lumineszcenciagátlás, enzimaktivitásból integrált érték a mérési időszakra vonatkozó görbe alatti terület, mozgásképtelen/ elpusztult állatok számából a koncentráció-hatás görbe egyezményes pontjai (20 illetve 50%-os gátláshoz tartozó koncentráció: **EC₂₀** és **EC₅₀**).

2. Különböző trofikus szintről származó vízi tesztorganizmusok bemutatása

2.1. Algateszt

Az **egysejtű algákat** felhasználó teszteknek számos változata van: több fajt is lehet alkalmazni, a sejtszaporulat meghatározására is többféle módszer létezik, és a tesztstruktúra expozíciós idejét tekintve is válogathatunk a szabványosított és nem szabványosított módszerek közül. 96 órás alganövekedési teszt a toxikus vegyi anyagoknak az elsődleges termelőkre gyakorolt gátló hatását vizsgálja. Tesztorganizmusként édesvízi és tengeri algákat használhatunk. Az ASTM (American Society for Testing and Materials) az alábbi algákat ajánlja tesztelésre:

Édesvízi algák:

- Zöld algák: *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*
- Kék algák (cianobaktériumok): *Microcystus aeruginosa*, *Anabena flos-aquae*

Tengeri algák:

- Kovamoszatok: *Skeltonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*
- Ostoros moszatok: *Dunaliella tertoelecta*

2.1.1. A teszt jellemzői

Teszt típusa: Egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, akut toxicitási teszt

Tipikus alkalmazási területe: Vízben oldható vegyi anyagok; felszíni vizek, talajvizek, szennyvizek toxikológiai vizsgálata.

Tesztorganizmus: egysejtű édesvízi algafajok: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*

Teszt mérési végpontja: sejtszám/ ml, optikai denzitás értékek, extrahált klorofill-tartalom

Teszt vizsgálati végpontja: szaporodásgátlás (EC₂₀ és EC₅₀ értékek)

Szükséges műszer: fénymikroszkóp vagy spektrofotométer

A teszt időtartalma: 24-96 h

A teszt szabványosított formája:

MSZ 21978-2:1986 Veszélyes hulladékok vizsgálata. Algateszt (metanolos klorofill extrakció)

MSZ 21978-36:1989 Veszélyes hulladékok vizsgálata. A mérgezőképesség meghatározása algatenyésztéssel

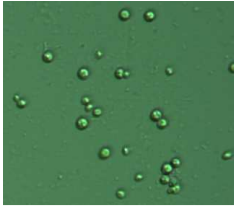
MSZ EN ISO 8692:2005 Vízminőség. Édesvízi alga növekedésgátlási tesztje egysejtű zöldalgafajokkal

ISO 8692:2004 Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae

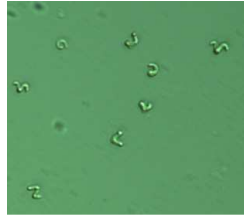
OECD 201 Alga, Growth Inhibition Test (extrakció nélkül)

2.1.2. A tesztorganizmusok bemutatása, fenntartása

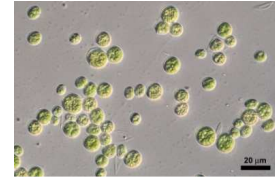
Az algateszt egysejtű édesvízi algafajokat használ, léteznek olyan tesztek, melyek tengeri algákat vagy telepes felépítésű, makroalgákat alkalmaznak tesztorganizmusként, itt csak az édesvízi, egysejtűekkel foglalkozunk. Néhány algatesztben használható faj mikroszkópos képe a 1-1., 1-2. és 1-3. ábrákon látható.



1-1. ábra *Chlorella vulgaris* mikroszkópos képe (Képet készítette: Nagy Zsuzsanna)



1-2. ábra:
Pseudokirchneriella subcapitata mikroszkópos képe (Képet készítette: Nagy Zsuzsanna)



1-3. ábra: *Scenedesmus subspicatus* mikroszkópos képe (Forrás: Culture Collection of Autotrophic Organisms)

Az egysejtű algafajokat egyszerűen fenntarthatjuk tápagon és tápsóoldatban is. Az alga növekedését 10:14 órás sötét:világos ciklussal, (megvilágítás paraméterei: fényerősség: $0,72 \times 10^{20}$ foton/m²s \pm 20 %, 8000 lux, spektrum:400-700 nm, színhőmérséklet 4200K) és $21,5 \pm 1^\circ\text{C}$ hőmérséklettel biztosítjuk termosztát szekrényben.

Sejtszaporulat kvantitatív meghatározása

- közvetlenül az algaszuszpenzió optikai denzitásának (OD) mérése 670 nm (AlgalToxKit) vagy 750 nm-en (MSZ 21978-2:1986)
- sejtszámlálás Bürker-kamrával
- metanolos extrakcióval, majd extinkció mérése fotométerrel 750 nm-en és 665 nm-en (MSZ 21978-2:1986)

2.1.3. A mérés leírása

A mérés során ajánlott olyan gyorsan szaporodó algákkal dolgozni, amelyek fenntarthatók laboratóriumi körülmények között és tesztre is alkalmas fajok. Ilyen például a:

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662)
- *Scenedesmus subspicatus* (86.81 SAG)
- *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b)

A méréshez felhasználni kívánt algaszuszpenzió készítése

Minden folyamatot steril fülke alatt végzünk. A teszt indításához megfelelő koncentrációjú algaszuszpenzióra van szükség. Ehhez friss alga tápoldattal mossuk le az algasejteket az agar felszínéről, majd Bürker-kamra segítségével határozzuk meg az algakoncentrációt. A teszthez az algaszuszpenzió kiindulási sejtszáma a 10^4 sejt/ml körüli legyen.

Inokulum készítése

Annak érdekében, hogy a tesztorganizmus (algasejtek) adaptálódjon a teszt körülményeihez, inokulumot készítünk a tesztoldattal 2-3 nappal a teszt indulása előtt. Ezt az inokulumot a teszt körülményeinek megfelelően kell inkubálni a teszt indítását megelőző időszakban.

A mérés kivitelezése

A mérést a mintaszám alapján kalkulált, megfelelő számú légáteresztő dugóval ellátott Erlenmeyer lombikban indítjuk el. A tesztelni kívánt vegyületből illetve mintából egy hígítási sort készítünk. Fontos, hogy az alkalmazott koncentráció-tartományon belül az algákra gyakorolt toxikus hatás detektálható legyen. Teszteléskor legalább 5 tagú hígítási sorral kell dolgozni és a leghígabb tag nem szabad, hogy megfigyelhető toxikus hatást gyakoroljon az algaszaporodásra, míg a legtöményebb tag a kontrollhoz képest legalább 50%-os gátlást kell, hogy eredményezzen az alga szaporodásában. Minden lombikba bemérjük a megfelelő

mennyiségű növényi tápanyagból, vízből, a tesztanyag törzsoldatából és az exponenciális szaporodási szakaszban lévő algakultúrából származó inokulumból előállított tesztközeget.

Az így összeállított lombikokban lévő tesztközegeket rázatjuk és megfelelő világítás mellett inkubáljuk $21,5 \pm 1$ °C-os termosztátban. A lombikokba lévő szuszpenziók sejtszámát az indulástól számított 24, 48 és 72 óránként meg kell határozni. A mérést kis mennyiségű (kb. 5 ml térfogatú), a tesztedényből pipettával steril körülmények között kivett mintával végezzük, amit már nem teszünk vissza a tesztközegbe.

Az oldatok pH-ját a teszt indulásakor és 72 órát követően is meg kell mérni, a pH nem változhat többet, mint 1 egység.

Az eredmények kiértékelése és interpretációja

A szaporodásgátlás megállapításánál a szaporodást vagy a szaporodási sebesség csökkenését az azonos körülmények között tartott kontroll kultúrához viszonyítjuk. A sejtszámból minden tesztkoncentrációhoz és a kontrollhoz tartozó szaporodási görbét felvesszük az idő függvényében. A szaporodásgátlás kiszámolása kétféleképpen történhet:

1. Szaporodási görbe alatti terület

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

t_1 – első mérés időpontja [h]

t_n – n-dik mérés időpontja [h]

N_0 – kiindulási sejtszám [db]

$N_1 - t_1$ időpontban mért sejtszám [db]

$N_n - t_n$ időpontban mért sejtszám [db]

Ebből a szaporodásgátlás kiszámítása az ökotoxikológiában szokásos módon történik:

$$H = 100 * \frac{A_{kontroll} - A_{min ta}}{A_{kontroll}} \quad [\%]$$

H – szaporodásgátlás (%)

$A_{kontroll}$ – kontroll tenyészet szaporodási görbéje alapján számolt területérték

$A_{min ta}$ – mintával érintkeztetett tenyészet szaporodási görbéje alapján számolt területérték

2. Szaporodási sebesség [h^{-1}]

$$\mu = \frac{\ln(N_n) - \ln(N_0)}{t_n} \quad [h^{-1}]$$

t_n – az utolsó mérés időpontja a teszt megkezdésétől mérve [h]

N_0 – kiindulási sejtszám [db]

N_n – mért végső sejtszám [db]

Ebből a szaporodásgátlás kiszámítása az ökotoxikológiában szokásos módon történik:

$$H = 100 * \frac{\mu_{kontroll} - \mu_{min ta}}{\mu_{kontroll}} \quad [\%]$$

H – szaporodásgátlás (%)

$\mu_{kontroll}$ – kontroll tenyészet szaporodási sebessége [h^{-1}]

$\mu_{min ta}$ – mintával érintkeztetett tenyészet szaporodási sebessége [h^{-1}]

2.2. *Tetrahymena pyriformis* szaporodásgátlási teszt

Toxikus fémekre tapasztalataink szerint kevésbé érzékeny tesztorganizmus a *Tetrahymena pyriformis*, szerves szennyezőanyagok toxicitására viszont annál inkább. A Tetrahyménák az ökotoxikológiában is úgy, mint a sejtbiológiai és genetikai kutatásokban, az **eukarióta** sejtet képviselik.

A *Tetrahymena pyriformis* vízben élő állati egysejtű. A protozoák országán belül, a legfejlettebb fajokat magában foglaló csillós egysejtűek törzsébe (Ciliopora) tartozik. A *Tetrahymena pyriformis* mérete körülbelül 25–90 µm, nevét körtére emlékeztető alakjáról, illetve a sejtészáj négy mozgó, hártyaszerű képletéről kapta. Külső felületén sűrű, hajszerű bevonatot, képeznek a csillók, melyeknek koordinált mozgását primitív idegrendszer irányítja. Kutatások kedvelt tesztorganizmusa, a könnyű fenntarthatósága, gyors szaporodása miatt, de főként azért, mert sejtje sokban hasonlít a nála jóval fejlettebb gerincesek sejtjeihez.

A sejtszám változását nyomon követve a vegyi anyagok és környezeti minták (talaj, üledék, felszíni és felszín alatti víz, továbbá szennyvíz) toxikus hatása vizsgálható. A teszt módszer Gruiz és Leitgib (2006) fejlesztették ki, később a módszer a BME ABÉT tanszéken továbbfejlesztésre került.



2–1. ábra: *Tetrahymena pyriformis* mikroszkópos képe (Képet készítette: Molnár Mónika)

2.2.1. A teszt jellemzői

Teszt típusa: Egy fajt alkalmazó, akut, laboratóriumi teszt

Alkalmas: Vízben oldható vegyi anyagok; felszíni vizek, talajvizek, szennyvizek toxikológiai vizsgálata

Tesztorganizmus: *Tetrahymena pyriformis*, állati egysejtű

A tesztorganizmus kora: 6 napos

Teszt mérési végpontja: sejtszám/ ml

Teszt, vizsgálat végpontja: szaporodásgátlás (EC₂₀ illetve EC₅₀)

Szükséges berendezés, eszköz: fénymikroszkóp, Bürker-kamra

Tesztelés időtartalma: 96 h

A teszt szabványosított formája: nincsen

2.2.2. A tesztorganizmus bemutatása, fenntartása

A *Tetrahymena pyriformis* kutatások kedvelt modellállata, a könnyű fenntarthatósága, gyors szaporodása miatt, de főként azért, mert sejtmembránjának összetétele, kulcsenzimjei és bizonyos hormonok (inzulin, adrenalin) termelése az emlősökkel mutat hasonlóságot. Triptont és peptont tartalmazó tápoldatban (T-P tápoldat) tartjuk fenn őket. Hetente 5 ml tápoldatba 100 µl sejtszuspenziót oltunk át az előző átolásból fenntartás céljából. Az átolás során figyeljünk arra, hogy a Tetrahyménák a sejtszuspenzió felső, oxigéndúsabb rétegében vannak, míg az alsóbb rétegben a halott sejtek ülepednek ki, ezért az átolás előtt ne keverjük fel az inokulumot és annak felső rétegéből oltunk át.

2.2.3. Mérés leírása

Inokulum előállítás a teszthez

A teszthez 6 napos tenyészetet használunk fel, a kiindulási inokulum sejtszámát úgy állítjuk be, hogy a kezdeti sejtszám az összeállított tesztoldatban 4 db/ml legyen

A bemérendő minta mennyiségét környezeti minta típusa és a kísérlet célja-jellege szabja meg, mennyisége a tápoldattal együtt 30 ml legyen. A sejtszámlálások időpontját sem határozzuk meg pontosan, mert ezt is a szennyezőanyag típusának, hatásmechanizmusának megfelelően, a legjellemzőbb időpont szerint adjuk meg ehhez előkísérletek vagy korábbi tapasztalok eredményei szükségesek.

A mérés kivitelezése

1. A tesztközeg összeállítása: 100 ml-es lombikokba 30–30 ml T-P tápoldatot, 468 µl antibiotikum mix oldatot, a sejtuszpenzióból 600 µl-t pipettázunk és végül bemérjük a mintát.
2. Sejtszámlálás és mintavétel a tesztoldatból: körülbelül 24 óránként számoljuk meg a sejteket fénymikroszkóp segítségével, minden mintavételnél 0,5 ml-t veszünk ki a felkevert sejtuszpenzióból, 20 µl 1 %-os formaldehid oldatot adunk hozzá, majd egy 2 µl-es csepp sejtszámát Bürker-kamrában fénymikroszkóp segítségével 100 vagy 400-szoros nagyításban megszámloljuk. Ügyeljünk arra, hogy a formaldehid hozzáadása után rövid időn belül számoljuk meg a sejteket, mert kipukkadhatnak.

Az eredmények értékelése és interpretációja

Meghatározzuk a vizsgált minták hígításainak százalékos sejtszám-változását a kontrollhoz viszonyítva, a kapott százalékos szaporodásgátlási értékeket pedig a szennyezőanyag koncentrációval ábrázolva megállapítjuk az EC₂₀ és EC₅₀ értékeket az egyes időpontokban.

2.3. *Lemna minor* békalencse szaporodásgátlási teszt

Főleg két **békalencse** fajjal végeznek toxicitási méréseket: *Lemna minor* és *Lemna gibba*. Ez a növény egyre népszerűbb tesztorganizmus apró méretüknek és könnyű fenntarthatóságuknak, relatív gyors szaporodásuknak köszönhetően.

2.3.1. A teszt jellemzői

Teszt típusa: Egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, növényi, krónikus teszt

Alkalmas: Vízben oldható vegyi anyagok; felszíni vizek, talajvizek, szennyvizek toxikológiai vizsgálata.

Tesztorganizmus: *Lemna minor*

Teszt mérési végpontja: levélkeszám, klorofill-tartalom

Teszt, vizsgálat végpontja: szaporodásgátlás, EC₂₀ és EC₅₀

Tesztelés időtartalma: 7 illetve 9 nap

A teszt szabványosított formája:

ISO 20079:2005 – ISO Water quality -- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test

OECD 1948054:2002 – *Lemna* species Growth inhibition test

2.3.2. A tesztorganizmus bemutatása, fenntartása

A békalencsék a víz felszínén úszó egyszikű, lágyszárú vízinövények. Nagyon elterjedt, gyorsan szaporodó évelők. Méretük 2-12 mm lehet. Virágaik egyivarúak. Ritkán virágoznak, általában testük sarjadzásával szaporodnak. A békalencsék szaporodási sebessége eltérő, a *Lemna* nemzetség duplázódási ideje laboratóriumi körülmények között 0,35-2,8 nap. Az apró békalencse tömeges megjelenése eutrofizációt jelezhet. A békalencse fenntartása 21,5±1°C -on, időszakos megvilágítás (10:14 órás sötét:világos ciklus, 10 000 lux) mellett történik a Hoagland-féle tápoldatban. A tápoldatot hetente egyszer cseréljük a növények alatt.



3–4. ábra: *Lemna minor* békalencse (Képet készítette: Molnár Mónika)

2.3.3. A mérés leírása

A mérés kivitelezése

A tesztet 150 ml-es főzőpoharakban indítjuk. Minden mintát három párhuzamossal vizsgálunk. Kontrollként Hoagland tápoldatot használunk. A tesztoldatokból 50–50 ml-t bemérünk a főzőpoharakba, tetejükre 10–10 darab kétlevelű, sérülésmentes zöld színű békalencsét helyezünk. A főzőpoharakra fóliát helyeztünk a két leolvasási időpont között, hogy megelőzzük a bepárlódást, illetve az oldat szennyeződését a teszt ideje alatt.

Az összeállított kísérleti rendszereket 21,5±1 °C-os termosztátban inkubáljuk 7 napig megvilágítás mellett (10:14 órás sötét:világos ciklus, Daylite fénycső). A tesztelési idő alatt minden nap adott időpontban megszámloljuk a békalencsék leveleinek számát.

A 7. napon a vizsgált minták összklorofill tartalmának mérése indulhat. Először mindegyik főzőpohárból kivesszük az adott mintákban lévő békalencsét és szűrőpapíron tömegállandóságig szárítjuk őket. Ezután csiszolatos, kupakkal rendelkező kémcsövekbe tesszük az adott mintából kiemelt békalencsét és 5 ml 96%-os etanolt mérünk rájuk. 24 órán át, szobahőmérsékleten, sötét szobában állni hagyjuk őket.

Egy nap elteltével megmérjük minden minta optikai denzitását Sanyo SP55 UV/VIS spektrofotométerrel 3 különböző hullámhosszon (470, 649, 664 nm).

Eredmények kiértékelése és interpretációja

A 24 óránként megszámlolt levélkeszám alapján meghatározzuk az átlagos szaporodási sebességet, a kontroll oldatban lévő békalencsék átlagos duplázódási idejét. A teszt eredményeinek elfogadásához teljesülnie kell annak az elvárásnak, hogy a kontroll oldatban lévő növények átlagos duplázódási ideje nem haladhatja meg a 2,5 napot.

1. Átlagos duplázódási idő (T_D) számítása:
$$T_D = \frac{\ln 2}{\mu_{i-j}} \quad [\text{h}]$$

T_D – duplázódási idő

μ_{i-j} – átlagos szaporodási sebesség a kiindulási és a végpont között

2. Átlagos szaporodási sebesség (μ_{i-j}) számítása: $\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i}$ [h⁻¹]

μ_{i-j} – átlagos szaporodási sebesség az i-dik és a j-dik időpont között [h⁻¹]

N_i – levélszám az i-dik időpontban [db]

N_j – levélszám a j-dik időpontban [db]

t_i – i-dik időpont [h]

t_j – j-dik időpont [h]

3. A vizsgált minták összklorofill-tartalmának meghatározása:

$$chl_{a+b} = (5,24 \cdot A_{664} + 22,24 \cdot A_{649}) \cdot V \quad [\mu\text{g}]$$

A_{649} – 649 nm hullámhosszhoz tartozó abszorbancia érték

A_{664} – 664 nm hullámhosszhoz tartozó abszorbancia érték

V – a 96%-os etanol térfogata (ml)

A képlettel megkapjuk a mintákban inkubált, majd etanolba emelt békalencsék összklorofill-tartalmát μg -ban.

2.4. *Heterocypris incongruens* édesvízi kagylósrák immobilitási teszt

A teszt újdonságát az adja, hogy ezek a tesztorganizmusok a szennyezett üledékkel/talajjal való közvetlen érintkezésüknek köszönhetően a vizsgált közeg ösztotoxicitása (vízben oldott és szilárd fázishoz kötött szennyezőanyagból adódó toxicitása) mérhető.

2.4.1. A teszt jellemzői

Teszt típusa: Egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, állati teszt

Tipikus alkalmazási területe: Szerves és szervetlen vegyületekkel szennyezett édesvízi üledékek és talajok toxikológiai vizsgálata

Tesztorganizmus neve: *Heterocypris incongruens*

Teszt mérési végpontja: A mozgó állatok száma valamint újabb, még kidolgozás alatt álló mérési végpontok, mint például a mozgásképeség követése révén vizsgált egyedek által megtett összes út, az átlagsebesség, stb.

Teszt vizsgálati végpontja: mozgásképeség gátlása (EC₂₀ és EC₅₀ értékek)

Tesztelés időtartalma: 3 nap

A teszt szabványosított formája:

ISO 14371:2012 – Water quality -- Determination of fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda)

2.4.2. A tesztorganizmus bemutatása, fenntartása

A **kagylósrákok** (*Ostracoda*) osztályába tartozó állatok legjellemzőbb tulajdonsága a kettős teknő, melybe a lágytest visszahúzódhat. Méretük 0,1–32 mm között változik. Az állat testét meszes héj fedi, melyet egy rugalmas sarokpánt nyit és egy haránt izomnyaláb zár. Amikor kinőtték a héjat, levedlik azt (vagyis elhagyja és újat növeszt). A héj hasítékából kinyúlik hét pár láb. Váltivarúak, de nem ismeretes még minden fajnak a hímje. Mind megtermékenyített, mind szűz peték révén is szaporodhatnak. A kagylósrákok élhetnek édes- és tengervizekben is. Fenéklakó állat, mely túrja az iszapot. Többnyire algával illetve apró vízi szervezetekkel táplálkoznak. Az állat fenntartása levegőztetett, kiforralt csapvízben 21,5±1°C -on, időszakos

megvilágítás (10:14 órás sötét:világos ciklus, 3000-4000 lux) mellett történik. Az állatok táplálása egysejtű algával történik.



4–5. ábra: *Heterocypris incongruens* (Képet készítette: Nagy Zsuzsanna)

2.4.3. A mérés leírása

A mérés kivitelezése

A mérőedényekbe bemérünk 10–10 ml-t a tesztelni kívánt mintákból, majd ezekbe átemelünk 10–10 darab tesztorganizmust. A mérés során 3 párhuzamossal dolgozunk. A mérőedényeket lefedjük és $21,5 \pm 1^\circ\text{C}$ -os termosztátban *inkubáljuk* 3 napig 10:14 órás sötét:világos ciklusú megvilágítás mellett. 24 óránként *megszámoljuk* az életben maradt állatokat.

Eredmények kiértékelése és interpretációja:

1. **immobilitási százalék** kiszámítása az egyes koncentráció értékekhez, az ökokológiában szokásos módon történik:

$$H = 100 * \frac{N_{kontroll} - N_{min\ ta}}{N_{kontroll}} \quad [\%]$$

H – immobilitási százalék (%)

$N_{kontroll}$ – a kontrollban életben maradt és mozgóképes állatok száma [db]

$N_{min\ ta}$ – a mintában életben maradt és mozgóképes állatok száma [db]

A teszt eredményeit csak abban az esetben fogadhatjuk el, ha a kontroll mérésben használt állatok immobilitási százaléka nem haladja meg a 20%-ot.

2.5. *Daphnia* akut immobilizációs teszt

Ennél a tesztnél *Daphnia magna* és *Daphnia pulex* fajokat lehet használni. A *Daphnia* másképp vízibolha az egyik legelterjedtebb vízi tesztorganizmus. Teszteléshez a laboratóriumban nevelt harmadik generáció alkalmazható. Szabványosított formában akut immobilizációs és krónikus szaporodásgátlási teszt létezik. Az akut tesztnél 6 és 24 óránál ellenőrizzük a tesztorganizmusok mobilitását, míg a krónikus teszt minimum 14 napos, és a *Daphnia* szaporodását követjük nyomon. Ez a leirat csak az akut teszttel foglalkozik.

2.5.1. A teszt jellemzői

Teszt típusa: Egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, akut toxicitási teszt

Tipikus alkalmazási területe: Vízben oldható vegyi anyagok; felszíni vizek, talajvizek, szennyvizek toxikológiai vizsgálata

Tesztorganizmus neve: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*

Tezst mérési végpontja: mozgásképtelenség, egy perc alatti szívdobbanások száma

Tezst vizsgálati végpontja: mozgásképeség gátlása (EC_{20} és EC_{50} értékek)

A teszt időtartalma: 6-96 h

A teszt során felhasznált tenyészet kora: 24 órás

A teszt szabványosított formája:

MSZ 21976-18:1993 Települési szilárd hulladékok vizsgálata. Daphnia teszt

MSZ 21978-13:1985 Veszélyes hulladékok vizsgálata. Daphnia teszt

MSZ EN ISO 6341:1998 Víztisztaság. A mobilitásgátlás meghatározása *Daphnia magna* Strauson (*Cladocera, Crustacea*). Akut toxicitási teszt (ISO 6341:1996)

MSZ ISO 10706:2002 Víztisztaság. Anyagok hosszú távú mérgező hatásának meghatározása *Daphnia magna* Straus-on (*Cladocera, Crustacea*)

OECD 202 *Daphnia* species, acute Immobilisation Test, Part I – the 24 h EC50 acute immobilisation ntest, Part II – the reproduction test (at least 14 days)

2.5.2. A tesztorganizmus bemutatása, fenntartása

A *Daphnia magna* akár 5 mm-re is megnőhet, míg a *D. pulex* maximális mérete 2-3 mm, laboratóriumunkban *Daphnia magna*-val dolgozunk. A Daphniák szűznemzéssel szaporodnak, egy nőstény általában egyszerre 4-10 ivadéknak ad életet (ez időszak alatt a kikelt lárvák is nőstények). Az embriók fejlődése az anyaállat testében akár mikroszkóp nélkül is megfigyelhető. A fiatal nőstények négy napos koruktól már minden harmadik napon tovább szaporodnak, körülbelül 40 napos életükben akár 25 alkalommal. Ha kedvezőtlen körülmények közé kerülnek az állatok (alacsony hőmérséklet, kevés táplálék), a petékből hímek is kifejlődnek, és a nőstények által rakott petéket megtermékenyítik, ezek az úgynevezett tartós peték (ephibiumok), amelyek a kedvezőtlen körülményeknek ellenállnak. A petéket rakó nőstények könnyen megkülönböztethetők a szűznemzéssel szaporodó, élőket szülő társaiktól, mivel a fejlődő ephibium fekete pontként jól látható az állat hátsó végénél. Amikor a környezeti feltételek megint ideálissá válnak, a petéket rakó generáció átvált az eleve születésre és az új ivadékok már mind nőstények lesznek. A hím populáció kihal egészen addig, amíg az időjárási és táplálkozási feltételek romlani kezdenek.

Táplálékkul egysejtű alga szolgál a Daphniáknak, általában *Scenedesmus subspicatus* vagy *Chlorella vulgaris*. Legalább kétnaponta etetjük őket, a tenyésztővizük tartalmazzon körülbelül $5 \cdot 10^3$ sejt/ml algát. A Daphniák baktériumokat és élesztőt is esznek, ezek azonban könnyen túlszaporodnak és anaerob körülmények alakulnak ki a tenyésztővizükben, ezért a rendszeres etetéshez ez nem javasolt. Tenyésztővízként bármilyen víz használható, amelyben a Daphniák szaporodnak, ez lehet tápsókból és desztillált vízből előállított mesterséges víz, csapvíz, forrásvíz vagy szűrt akváriumvíz. A Daphniák szaporodásához és fenntartásához nem szükséges fény, azonban a fény biztosításával vizükben lévő egysejtű algák szaporodását és a megfelelő oldott oxigén-koncentráció fennmaradását segíthetjük, a baktériumok elszaporodását és az anaerob körülmények kialakulását pedig megakadályozhatjuk.



5–6. ábra: *Daphnia magna* (Képet készítette: Nagy Zsuzsanna)

2.5.3. A mérés leírása

A mérés előkészítése – A tesztre alkalmas egyedek kiválasztása

20–30 darab több, mint 7 napos, testükben embriókat hordozó anyaállatot különítünk el nagy lyukméretű osztályozóháló segítségével. A költőtasakból kiszabadult, 24 órás állatok mérete 1-2 mm közötti, az ilyen korú állatokat a nagyobb, anyaállatok közül kisebb lyukméretű osztályozóháló segítségével válogatjuk ki.

A mérés kivitelezése I: Immobilitási teszt

125–125 ml-es főzőpohárba bemérjük az 50–50 ml vizsgálni kívánt mintát. Ezután kiválogatunk 10–10 db 24 órás állatot, majd ezeket a mérőedényben lévő folyadékba helyezzük. 96 órán át $21,5 \pm 1$ °C -on 10:14 órás világos:sötét ciklusú megvilágítás mellett inkubáljuk a tesztorganizmusokat, 24 óránként szabad szemmel és/vagy sztereomikroszkóppal megszámloljuk a mozgásképes állatokat.

A mérés kivitelezése II: Szívritmus mérés

Az immobilitási teszthez képest itt nagyobb méretű egyedekkel dolgozunk, két okból kifolyólag. Egyrészt a 24 órás állatok szívdobbanása sztereomikroszkóp alatt is nagyon nehezen észlelhető méreténél fogva, másrészt a szívverésük is sokkal gyorsabb, növelve a számolási hibalehetőséget. A szívritmus mérést vájt tárgylemezen végezzük sztereomikroszkóp alatt. 40–40 μ l tenyésztővízbe egy közepes méretű egyedeket helyezünk speciálisan kiképzett hálókánállal. Ebben a cseppben megszámloljuk az egyed alap (kezelés előtti) szívritmusát; háromszor 10 másodperces időintervallumban mért szívverések számának átlagát. Ezután 200 μ l mintát pipettázunk az egyedre. 10 perces kontaktidő után ismét megszámloljuk háromszor a 10 másodperces időtartam alatti szívverések számát, majd átlagoljuk az értékeket. Minden mintát 10–10 db teszttállattal vizsgáljuk meg.

Eredmények értékelése és interpretációja

1. immobilitási százalék

$$H = 100 * \frac{N_{kontroll} - N_{min ta}}{N_{kontroll}} \quad [\%]$$

H – immobilitási százalék (%)

$N_{kontroll}$ – kontrollban életben maradt és mozgásképes állatok száma [db]

$N_{min ta}$ – mintában életben maradt és mozgásképes állatok száma [db]

A teszt eredményeit akkor fogadjuk el, ha a kontrollban az állatok több mint 80 %-a mozgásképes maradt.

2. szívritmus változását követve a kontroll, alap szívritmushoz képesti gátlási százalékot határozzuk meg

$$H = 100 * \frac{N_{kontroll} - N_{min ta}}{N_{kontroll}} \quad [\%]$$

H – gátlási százalék (%)

$N_{kontroll}$ – kontroll szívritmus [db/min]

$N_{min ta}$ – mintával érintkezett egyedek szívritmusa [db/min]

2.6. Haltesztek

A halakat más vízi gerincesek és makrogerinctelenek mellett kiterjedten alkalmazzák vízi ökoszisztémák érzékenységének jellemzésére, a vízi ökoszisztémát veszélyeztető vegyi anyagok hatásának vizsgálatára. A vízi ökoszisztémát jellemző tesztorganizmusok beszerzése általában bonyolult feladat, mert nehézkes egészséges és állandó minőségű tesztorganizmushoz jutni. A halpopulációk nagyban eltérhetnek egymástól, ez főként ugyanannak a halfajnak a laboratóriumi és vad változata esetén jelentős. A másik kényes kérdés a vízminőség. Tiszta, szennyezetlen vízben kell fenntartani a teszteléshez használni kívánt állatokat, valamint szintén tiszta vizet kell alkalmazni tesztelés során hígítóvízként. A halteszteknel jól ismert LC₅₀ értéket adó toxikus anyagot használunk referenciaként, amelynek segítségével minősíthetjük a tesztrendszerünket és a tesztorganizmusunkat. A tesztrendszerben mért és kontrollált hőmérséklet, pH, vízkeménység megvédheti a tesztet a nem megfelelő körülmények miatti rossz eredményektől. A legnépszerűbb édesvízi tesztalak a *Pimephales promelas*, a *Lepomis macrochirus*, az *Ictalarus punctatus* és az *Oncorhynchus mykiss*. A tesztállatok kiválogatásánál arra kell törekednünk, hogy korban és méretben azonos egyedekkel dolgozzunk. Fialat állatokat válasszunk, melyek tömege 1,0–5,0 g között változhat, valamint a leghosszabb hal mérete ne legyen nagyobb, mint a legkisebb kétszerese. A tesztedény vízszintes mérete legalább háromszorosa legyen a legnagyobb állat hosszának, mélysége legalább háromszorosa a legnagyobb állat magasságának. A tesztoldat minimum 150 mm mély legyen a 0,5 g-nál nagyobb, 50 mm a 0,5 g-nál kisebb méretű halak számára. Naponta legalább egyszer etessük a halakat jó minőségű táplálékkal. A teszt időtartalma statikus teszt esetén 96 óra, hosszabb idejű teszteknél legalább 96 óránként frissítésre van szükség. A teszt során a víz hőmérséklete a fajtól függően változhat (pl. *O. mykiss* esetében 12 °C, *P. promelas* esetén 25°C). A víz pH-ját is a tesztállat igénye szerint állítják be. A megvilágítás intenzitása általában nincs megadva, de fontos, hogy a 16 órás megvilágítást 8 órás sötétség kövessen. Végpontként a pusztulás vagy a mozgásképtelenség mérhető.

2.7. A tesztleírások során felhasznált források:

Culture Collection of Autotrophic Organisms ([CCALA](http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php)) Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, [<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php>]
The Taxonomicon: Brands, S.J. (comp.) 1989-present. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. [<http://taxonomicon.taxonomy.nl/>]
MSZ 21978-2:1986 Veszélyes hulladékok vizsgálata. Algateszt (metanolos klorofill extrakció)
MSZ 21978-36:1989 Veszélyes hulladékok vizsgálata. A mérgezőképesség meghatározása algaanyagokkal
MSZ EN ISO 8692:2005 Vízminőség. Édesvízi alga növekedésgátlási tesztje egysejtű zöldalgafajokkal
ISO 8692:2004 Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
OECD 201 Algae, Growth Inhibition Test
Gruiz Katalin, Horváth Beáta, Molnár Mónika: Környezettoxikológia. Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára, Műegyetemi Kiadó, 2001
Leitgib, L., Kálmán J. és Gruiz K. (2007) Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites Chemosphere 66, 3, 428-434
Missouri Botanical Garden [<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/media.htm>]
ISO 20079:2005 – ISO Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test
OECD 1948054:2002 – *Lemna* species Growth inhibition test
Brehm, az állatok világa, Digitális kiadás: Arcanum Adatbázis Kft. 2000. [<http://mek.oszk.hu/03400/03408/html/>]
John Clare, B.A., Ph.D. (2007) *Daphnia*: An Aquarist's Guide, Caudata.org, Newt & Salamander Information Portal [<http://www.caudata.org/daphnia/>]
OECD 202 *Daphnia* species, acute Immobilisation Test, Part I – the 24 h EC50 acute immobilisation ntest, Part II – the reproduction test (at least 14 days)
MSZ 21976-18:1993 Települési szilárd hulladékok vizsgálata. *Daphnia*teszt
MSZ 21978-13:1985 Veszélyes hulladékok vizsgálata. *Daphnia*teszt

MSZ EN ISO 6341:1998 Vízminőség. A mobilitásgátlás meghatározása Daphnia magna Strauson (Cladocera, Crustacea). Akut toxicitási teszt (ISO 6341:1996)
MSZ ISO 10706:2002 Vízminőség. Anyagok hosszú távú mérgező hatásának meghatározása Daphnia magna Straus-on (Cladocera, Crustacea)