



KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIA

Környezettoxikológia helye, szerepe– toxicitási tesztek I – II.

Molnár Mónika

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Mérnökstanári Mesterszak 2018

TEMATIKA - 1-2. előadás

- ❖ Környezettoxikológia jelentősége, szerepe
- ❖ Toxicitási tesztek osztályozása
- ❖ Tesztorganizmusok
- ❖ Egy fajt alkalmazó tesztek
 - Szárazföldi ökoszisztéma tesztelése - egy fajt alkalmazó talajtesztek
 - Vízi ökoszisztéma tesztelése - egy fajt alkalmazó tesztek
- ❖ Több fajt alkalmazó tesztek csoportjai
 - Mikrokozmosz, mezokozmosz
 - Szabadföldi vizsgálatok

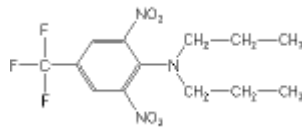


Veszély



KOCKÁZAT

▪ Vegyi anyag



Veszélyessége: kémiai szerkezetéből adódó *immanens* tulajdonság

Mindent ami problémát okoz meg kell ismerni!!



Vegyi anyagok tesztelése

- *Vegyi anyag kockázata a környezettel való kölcsönhatás révén nyilvánul meg*
- *A környezeti kockázat számszerűsített értéke a környezet-védelemmel, környezet-gazdálkodással kapcsolatos döntések tudományos alapja*



▪ Környezeti minták – szennyezett környezet



Vegyi anyag kikerül a környezetbe



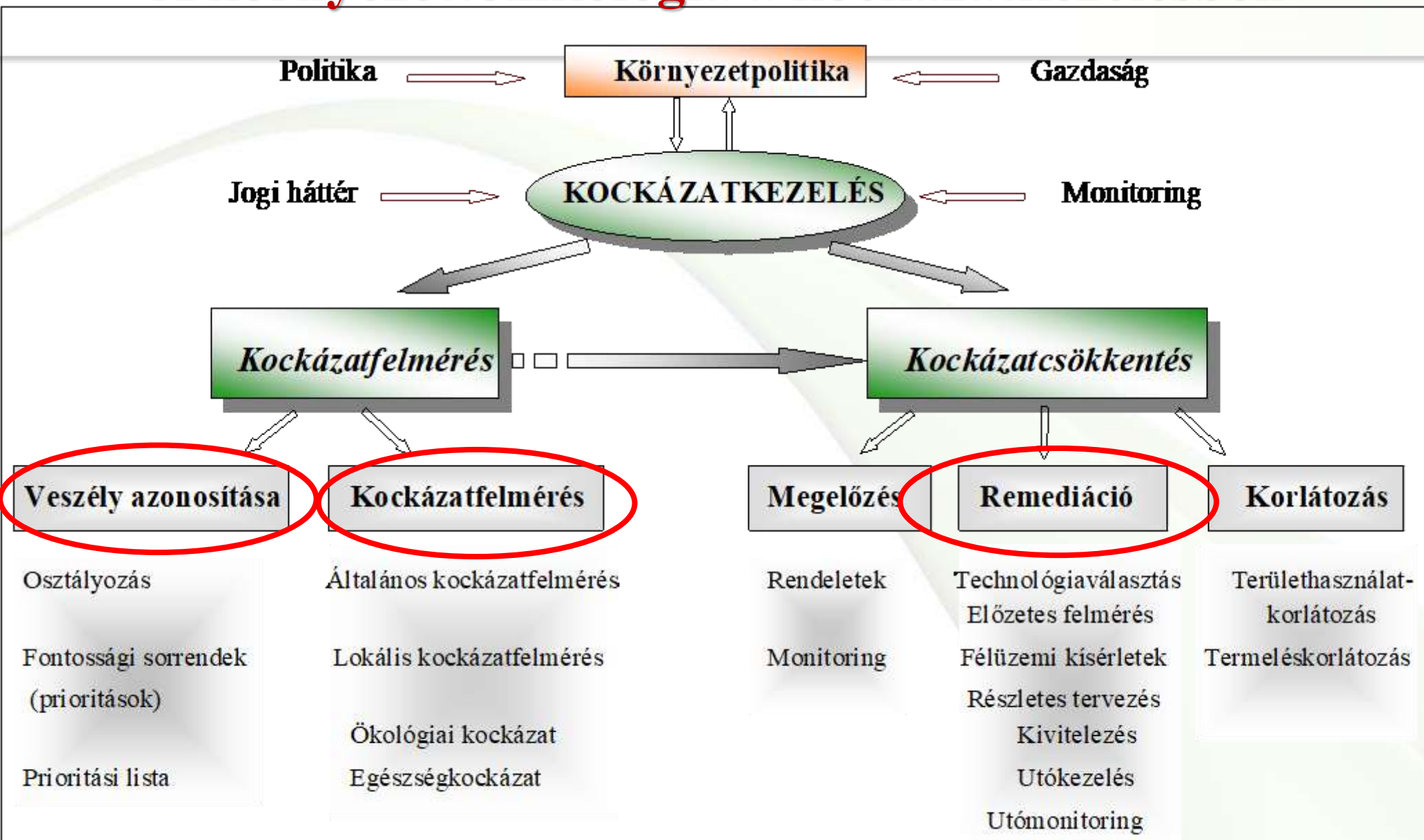
KOCKÁZAT

A környezettoxikológia helye és szerepe

- **A környezettoxikológia** a vegyi anyagoknak az ökológiai rendszerek szerkezetére és funkciójára gyakorolt hatását vizsgálja → előrejelzés a teljes ökoszisztémára. Az embert az ökológiai rendszer részeként kezeli.
- **Ökológiai rendszerek vizsgálata** → a molekuláris szinttől az egyed és a közösség szintjén keresztül a teljes ökoszisztémáig.
- **Multidiszciplináris**, egy sor szakterület együttműködésére alapoz.
- **Vegyi anyagok és szennyezett területek kockázatának jellemzése** → támogatja a környezetmenedzsment és környezetpolitika döntéseit.
 - Hatáson alapuló határértékek és más környezetminőségi kritériumok képzéséhez
 - Monitoring-rendszerek tervezéséhez
 - Kockázatcsökkentési intézkedésekkel kapcsolatos döntésekhez...



A környezettoxikológia a kockázatkezelésben



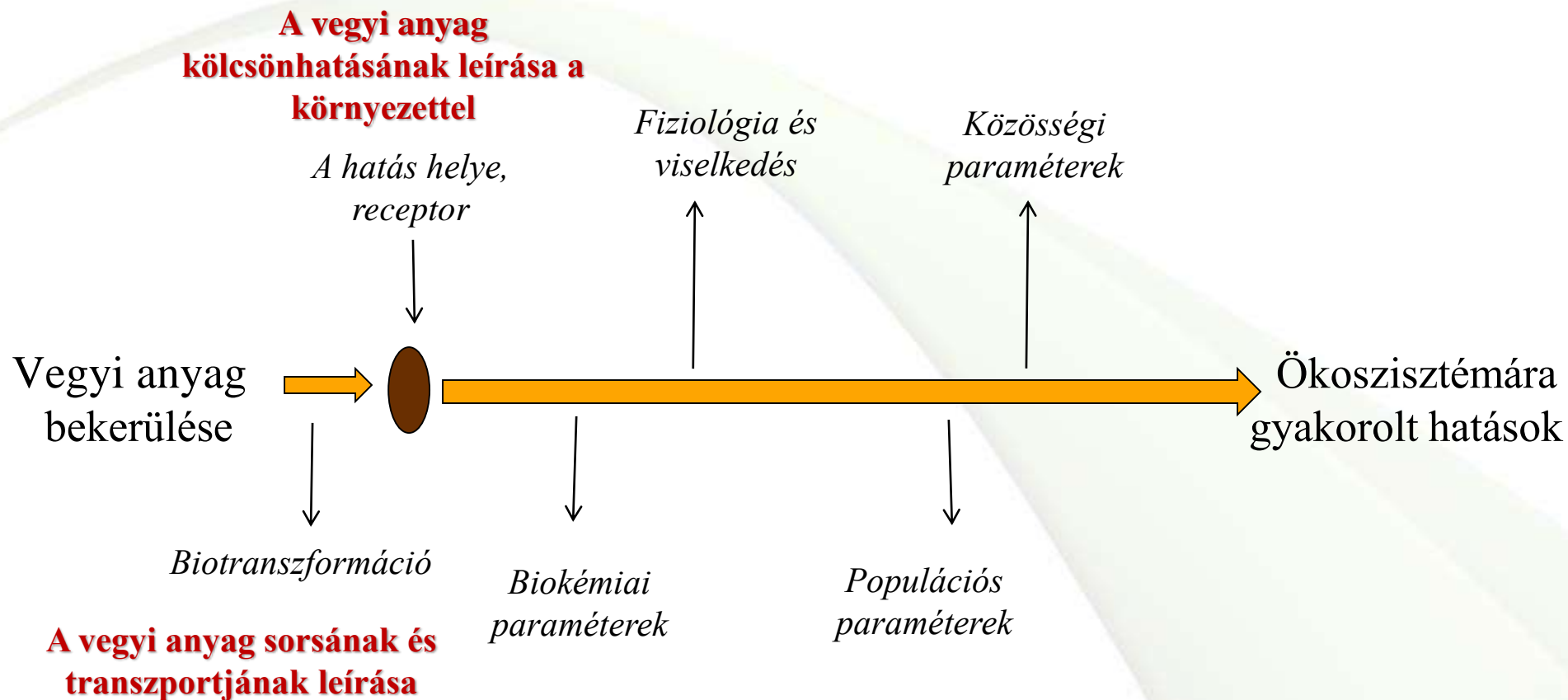
DEFINÍCIÓK

- **Környezettoxikológia:** a környezettoxikológia a környezetbe került **vegyi anyagok káros hatását** vizsgálja. Vizsgálja az **ökoszisztémára és az emberre gyakorolt káros hatásokat**. Mérési, tesztelési módszerei fizikai-kémiai és biológiai végpontok alapján következtet a káros hatások nagyságára. Teljes ökoszisztémák minden részletére kiterjedő vizsgálata nem lehetséges, ezért **kiválasztott, jellemző fajok vagy laboratóriumi tesztorganizmusok** válasza alapján következtetünk az ökoszisztéma egészére.
- **Vegyianyag:** **vegyi úton előállított vagy átalakított anyag**, melyet kémiai sajátosságai miatt gyártunk és használunk fel. A vegyi anyag **környezeti kockázata veszélyességéből és a környezettel való kölcsönhatásából adódik**, nagysága a vegyi anyag környezeti koncentrációjának és az ártalmatlan koncentrációnak a hányadosa. A **környezetbe kikerült veszélyes vegyi anyag a szennyezőanyag**.

A vegyi anyag kölcsönhatása a környezettel 1.

1. A vegyi anyag környezetbe kerülése után **kölcsönhatásba lép a környezettel**. Terjed, megoszlik a különböző fázisok között, átalakul, degradálódik, stb. Ezek a folyamatok határozzák meg a vegyi anyag környezeti koncentrációját, azt, amely eléri a biota tagjait és hat rájuk.
2. A vegyi anyag kölcsönhatásba lép az **élőlény egy aktív helyével**, melyet **molekuláris szinten** kell értelmeznünk. A hatás molekuláris szinten lehet egy élőlény életfontosságú szerkezeti eleme vagy valamely fontos szereppel bíró molekulája, pl. enzimfehérje, nukleinsav vagy membránreceptor.
3. A molekuláris szintű kölcsönhatás eredményeképpen **magasabb szintekre** is áttevődik és megjelenik a hatás, pl. biokémiai vagy fiziológiai szinten, a viselkedés szintjén, a populáció, a közösség vagy az egész ökoszisztéma szintjén.

A környezettoxikológia fő funkciói



A vegyi anyag hatásainak leírása és jellemzése a környezettel

A vegyi anyag kölcsönhatása a környezettel 2.

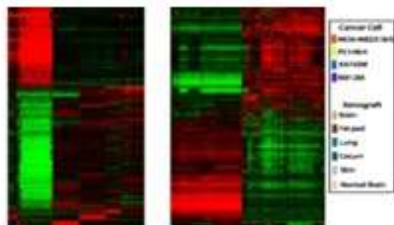
- **Molekuláris szinten; biokémiai paraméterek:** Stresszfehérjék termelése, metallothionein termelés, acetilkolin-észteráz gátlás...
- **Szervezet szintjén; fiziológia és viselkedés:** Kromoszómasérülések, daganatképződés, teratogén hatások, szaporodóképesség, viselkedés megváltozása: kompenzáló viselkedés, pusztulás...
- **Populáció szintjén:** A populáció sűrűsége, produktivitása, párzás sikeressége...
- **Közösség szintjén:** A közösség összetétele, a közösség diverzitása, a közösség stabilitása, energiafelhasználásának hatékonysága...
- **Ökoszisztéma szinten:** A fajok összetétele és eloszlása, anyagcsere, elemkörforgalom,
a táj megváltozása...

Mechanisztikus
betekintés

Reprodukálhatóság, specifikusság

Molekuláris paraméterek

- Genomika
- Transzkriptomika
- Proteomika
- Metabolomika



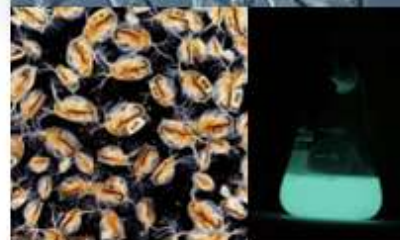
Organizmus (egyed) szintjén

- Viselkedés és fiziológia
- Túlélés, pusztulás
- Szaporodási funkciók
- Mozgás, táplálkozás, keringés
- Endokrin metabolizmus



Populáció

- Kolonizáció
- Predáció
- Reprodukció



Ökoszisztéma


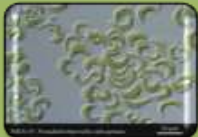




- Viselkedés
- Dinamika
- Szolgáltatások



Környezeti relevancia

Ökológiai
betekintés

Módszeregyüttes vízi ökoszisztéma tesztelésére

	Mikro-szennyezőanyagok meghatározása trimetilszilil (TMS) (oxim) észter/éterekként GC-MS eljárással (gázkromatográfiás elválasztás után tömegszelektív detektálás)	KÉMIAI ANALITIKA
	Algatesztek egysejtű algafajokkal: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> (szaporodásgátlás mikrotitrátor lemezben)	KÖRNYEZETTOXIKOLÓGIA
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoa) szaporodásgátlási teszt <i>Tetrahymena pyriformis</i> enzimaktivitás-gátlási teszt	
	Békalencse (<i>Lemna minor</i>) szaporodásgátlási teszt klorofilltartalom mérésével	
	<i>Heterocypris incongruens</i> kagylósrák immobilitási teszt	
	<i>Daphnia magna</i> immobilitási teszt <i>Daphnia magna</i> szívritmus teszt	

Környezeti minták ökotoxikológiai tesztelése (1)

Környezeti minták tesztelésének problémái:

- Szennyezőanyagok keveréke
- Kölcsönhatások
- Vizsgált közeg: extraktum, teljes talaj



Szennyezett talaj tesztelésének problémái

- Szennyezőanyag keverék: szinergizmus, antagonizmus
- Biotranszformáció: termékek hatása
- Biodegradáció
- Hozzáférhetőség: eltérő fizikai-kémiai és biológiai hozzáférhetőség
- Az analitikai program csak a szennyezőanyagok kis hányadát tartalmazza
- A környezeti minta biotikus és abiotikus tulajdonságai befolyásolják az eredményt

Környezeti minták ökotoxikológiai tesztelése (2)

Az ökotoxikológiai tesztelés megoldás a problémák egy részére

- Integrálja a toxikus anyagok kölcsönhatásait
- Integrálja a szennyezőanyag és a mátrix kölcsönhatásait
- A szennyezőanyag biológiailag hozzáférhető részét méri
- Kémiai analitikai módszerrel nem kimutatható anyagok hatását is méri
- Az analitikai programba be nem vett veszélyes anyagok hatását is méri

Ökotoxikológiai tesztekkel szemben támasztott követelmények

- Ökológiai relevancia, környezeti realitás
- Reprodukálhatóság
- Megbízhatóság
- Érzékenység

Vegyai anyagok viselkedése a környezetben

- **A toxicitás megoszlása a talaj szilárd-víz, valamint szilárd-gáz fázisai között** kockázatot jelent a felszín alatti vízre és a levegőre.
- Erős kötődés és rossz biodegradálhatóság a **kémiai időzített bomba** jelenségéhez vezet.
- Az **aktuális toxicitást** (az ökoszisztémában realizálódó hatást) szilárd fázisú minták és adszorbeált szennyezőanyag esetében a **direkt kontakt vagy interaktív** tesztek jellemzik megfelelően, ahol megnyilvánulhatnak a kölcsönhatások. Ezek eredményei magukban foglalják az összes komponens közötti kölcsönhatást: szennyezőanyagok, szennyezett közeg, organizmus(ok).



Vegyianyagok viselkedése a környezetben

- **Vegyianyagok sorsa és viselkedése a környezetben: mozgékonyág, hozzáférhetőség, biodegradálhatóság** befolyásolják az aktuális toxicitást.
- **Mozgékonyág, hozzáférhetőség** befolyásolja az aktuális toxicitást: kölcsönhatás a szennyezőanyagok, valamint a szennyezőanyag és a mátrix között. Transzport és hozzáférhetőség integrált metodikával jellemezhető.
- **Szorpciós kapacitás:** a szennyezőanyag és toxicitása megoszlik környezeti elemek fázisai között.
- **Integrált megközelítés:** fizikai-kémiai jellemzők + biológiai-ökotoxikológiai jellemzők **helyszín specifikus kockázat.**

INTEGRÁLT MÓDSZEREGYÜTTES

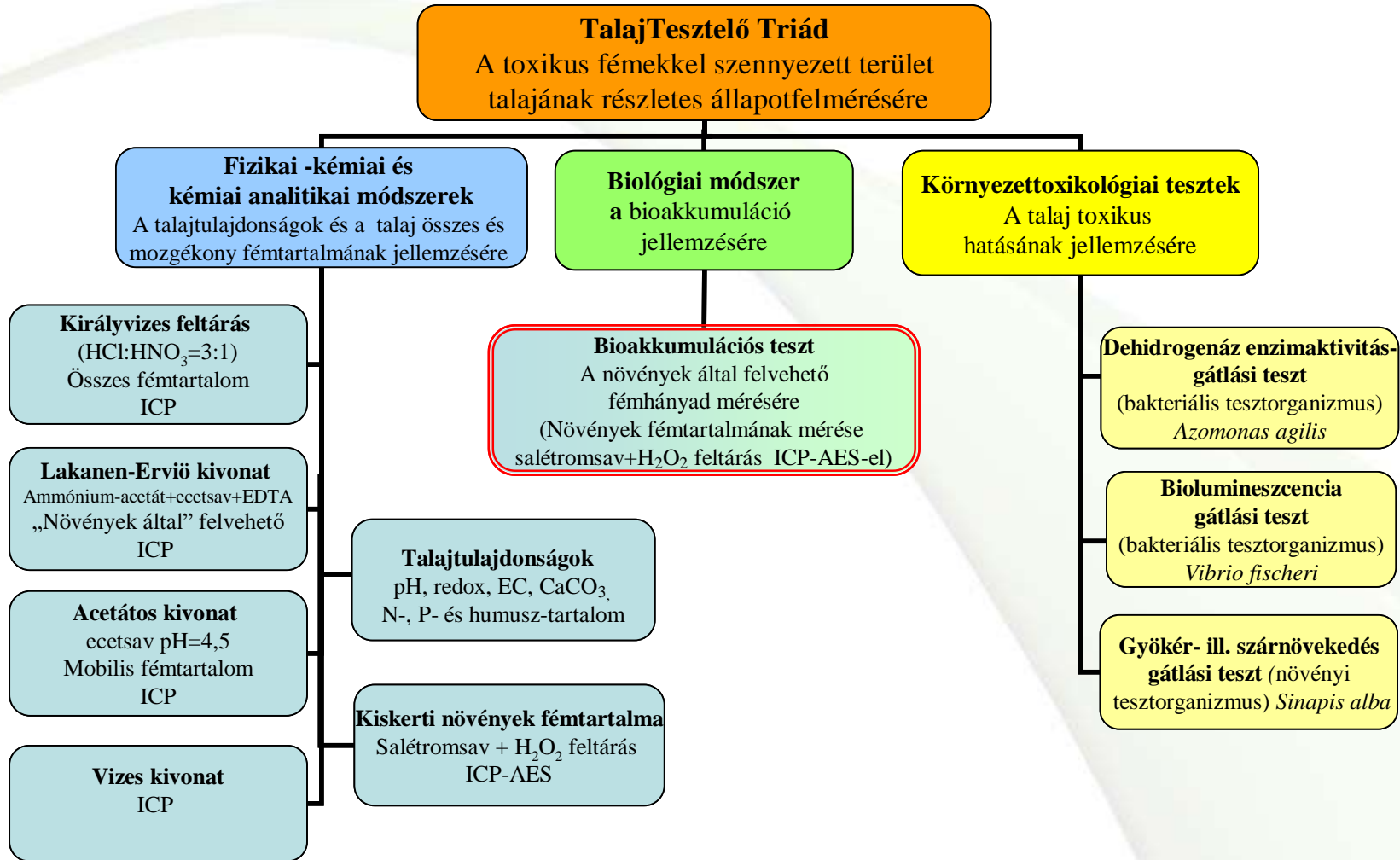
Fizikai-kémiai
módszerek

Talajökoszisztéma
jellemezése

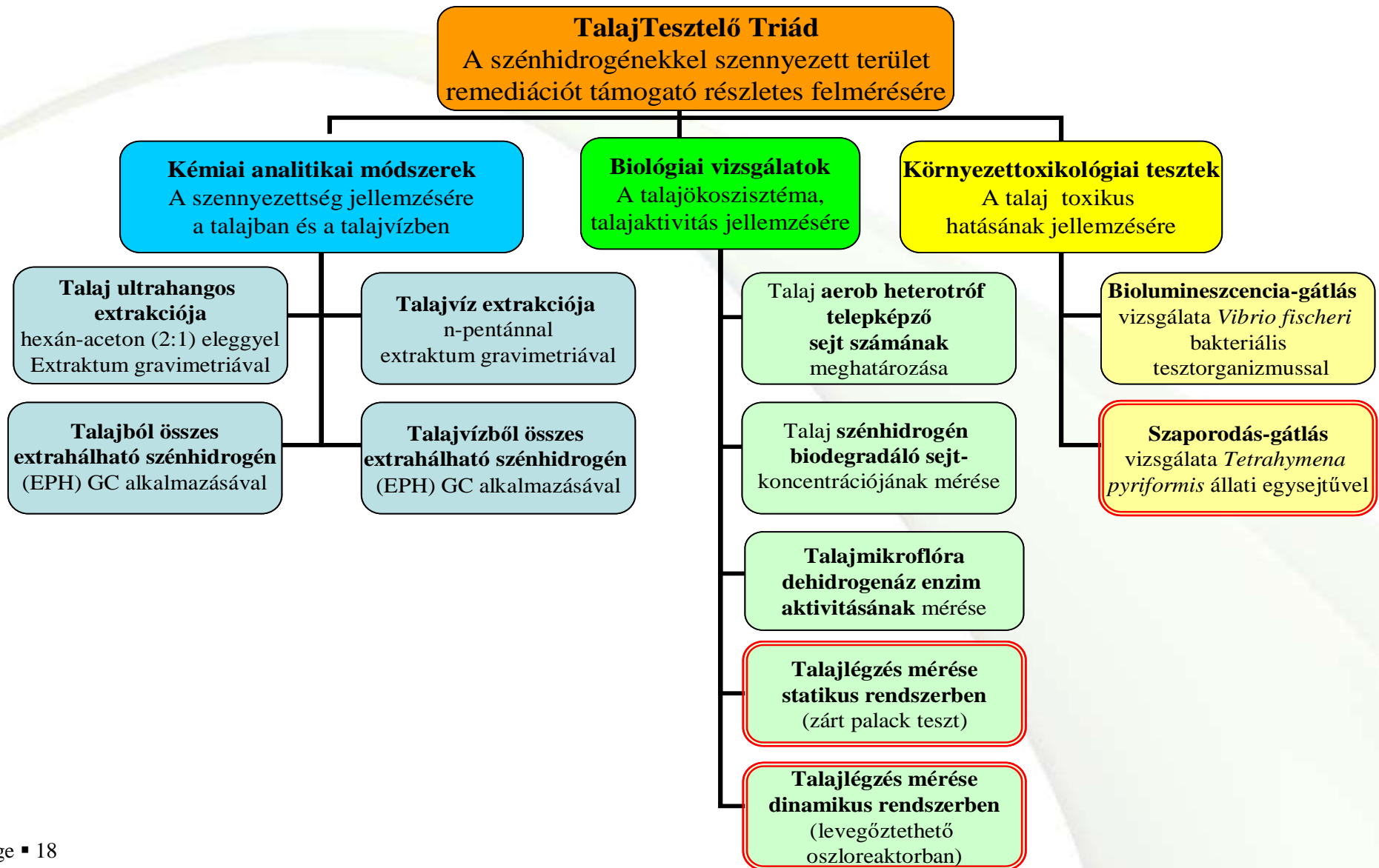
Ökotoxikológiai
tesztek



Tesztgyűttes fémekkel szennyezett kertek talajának részletes helyszínspecifikus szennyezettség-felmérésére



Szénhidrogénekkal szennyezett terület remediációt megalapozó felmérésére alkalmazott módszeregyüttes



Ökotoxikológiai tesztek osztályozása

▪ Fajok száma szerint

- Egy fajt alkalmazó teszt

- Több fajt alkalmazó

▪ A tesztorganizmus

- Baktérium

- Alga

- Gomba

- Növény

- Állat

- Több faj együtt (mikrokozmosz, mezokozmosz...)

▪ Tesztelendő ökoszisztéma

- Vízi ökoszisztéma

- Szárazföldi ökoszisztéma

▪ Expozíciós scenárió

- Teljes test

- Etetési kísérletek

- Ismert mennyiség beinjektálása (intramuszkuláris, intravénás)

- Kontrollált mennyiség gyomorba juttatása

Több fajt alkalmazó ökotoxikológiai tesztek

Több fajt alkalmazó tesztek (Callow, 1993)

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

+ Szabadföldi vizsgálatok

Ökotoxikológiai tesztek osztályozása

A vizsgált környezeti elemek és fázisok

- Víz és pórusvíz
- Extraktumok, eluátumok, csurgalékok, stb.
- Szilárd fázisú minták: teljes talaj, teljes üledék

Az ökotoxikológiai tesztelés célja

- Vegyi anyagok toxicitásának, mutagenitásának és teratogenitásának vizsgálata,
- Hatáson alapuló környezetminőségi kritériumok képzése
- Biomonitoring (integrált monitoring)
- Korai figyelmeztető rendszerek
- Környezeti minták toxicitásának, mutagenitásának és teratogenitásának vizsgálata
- Keverékek, hulladékok toxicitásának, mutagenitásának és teratogenitásának vizsgálata
- Közvetlen, hatáson alapuló döntési rendszerek

Ökotoxikológiai tesztek osztályozása

▪ **Teszt időtartama**

- Rövid idejű = akut
- Hosszú idejű = krónikus

▪ **Tesztorganizmus / tesztorganizmus faja**

▪ **Teszt típus**

- Laboratóriumi teszt (bioassay): akut, krónikus toxicitás, mutagenitás, teratogenitás
- Mikrokozmosz, mezokozmosz (több fajt alkalmazó toxicitási teszt)
- *In situ* biomonitoring (aktív, passzív)
- Diverzitás
- Biodegradáció
- Bioakkumuláció.

Ökotoxikológiai tesztek osztályozása 1.

▪ Leggyakoribb mérési végpontok

- **Toxicitási tesztek:** növekedés (sejtszám, tömeg, gyökérhossz, klorofill tartalom), túlélés, halál, immobilizáció, légzés: O_2 fogyasztás, CO_2 termelés, enzimaktivitások, ATP termelés, szaporodás, lumineszkálás etc.
- **Mutagenitási tesztek:** mutánsok száma, revertánsok száma, kromoszóma hibák
- Rákkeltő hatás: tumorok
- **Teratogenitási tesztek:** reprodukтивitás, cytogenetikai jellemzők
- **Biodegradációs tesztek:** O_2 fogyasztás, szubsztrátfogyás, terméképzés, CO_2 termelés
- **Bioakkumulációs tesztek:** az akkumulált vegyi anyag kémiai analízise

Értékelés és interpretáció

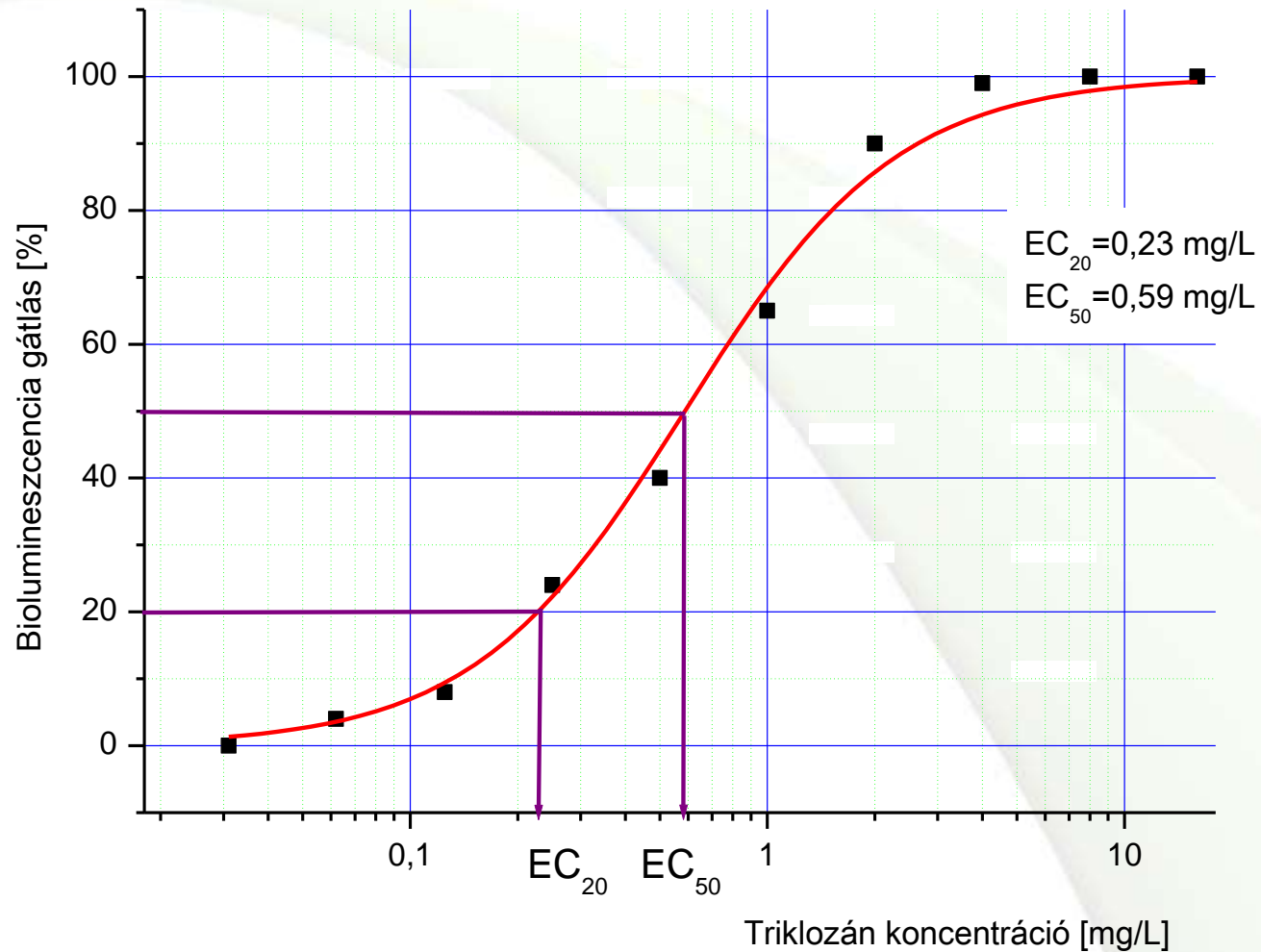
Koncentráció (dózis) – válasz összefüggés tesztelése

- **Mérési végpont:** a tesztorganizmus mérhető válasza; biokémiai, fiziológiai, viselkedési, populációs, közösségi jellemzők és ökoszisztéma hatások
- **Vizsgálati végpont:** a mérési végpontból statisztikai értékeléssel kapott, a toxicitást, vagy más káros hatást jellemző érték.

A jellemző koncentrációt a koncentráció (dózis) – hatás görbéről olvassuk le: az értékelés mindig statisztikai / grafikus-

- **EC₂₀, EC₅₀** (Effective Concentration)
- **ED₂₀ / ED₅₀** (Effective Dose)
- **LC₂₀ / LC₅₀** (Lethal Concentration)
- **LD₂₀ / LD₅₀** (Lethal Dose)
- **NOEC / NOEL** (No Observed Effects Concentration / Level)
- **NOAEC / NOAEL** (No Observed Adverse Effects Concentration / Level)
- **LOEC / LOEL** (Lowest Observed Adverse Effects Concentration / Level)
- **MATC** (Maximum Allowable Toxicant Concentration)
- **NOEC < MATC < LOEC**

Koncentráció-válasz összefüggés



Akut toxicitás - végpontok

Akut toxicitás mérése esetén (rövid idejű kitettség) a koncentráció – hatás görbéről leolvashatjuk a 10, 20 50 vagy 90 %-os gátlást okozó koncentrációt

LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} , LC_{90} = letális koncentráció (Lethal Concentration), mely a teszt-organizmus 10, 20, 50 vagy 90 %-ának pusztulását okozza.

EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{90} = hatásos koncentráció (Effect Concentration), mely a mérési vagy vizsgálati végpont 10, 20, 50, 90 %-os csökkenését okozza.

LD_{10} , LD_{20} , LD_{50} , LD_{90} = letális dózis (Lethal Dose), mely a tesztorganizmus 10, 20, 50 vagy 90 %-ának pusztulását okozza.

ED_{10} , ED_{20} , ED_{50} , ED_{90} = hatásos dózis (Effect Dose), mely a végpont 10, 20, 50, 90 %-os csökkenését okozza.

Krónikus toxicitás - végpontok

Krónikus toxicitás vizsgálatából, a koncentráció-hatás görbe alapján grafikusán, vagy statisztikai módszerekkel meghatározott értékeket szokták megadni:

NOEC = (No Observed Effects Concentration), az a legnagyobb koncentráció, amelynek nincs megfigyelhető hatása.

NOEL = (No Observed Effects Level Concentration), az a legnagyobb dózis, amely nem okoz megfigyelhető hatást.

LOEC = (Lowest Observed Effects Concentration) az a legkisebb koncentráció, amelynek hatása már megfigyelhető.

LOEL = (Lowest Observed Effects Level) az a legkisebb dózis, amelynek hatása már megfigyelhető.

MATC = (Maximum Allowable Toxicant Concentration), a szennyezőanyag maximális, még megengedhető koncentrációja.

A tesztorganizmus: általános követelmények

1. Hozzáférhetőség: a tesztorganizmus széles körben elérhető legyen

- Laboratóriumi kultúra
- Más kultúrák, törzsgyűjtemények
- Gyűjtés szabadföldről

2. Fenntartás

- Laboratóriumban fenntartható legyen
- Nagy mennyiségben elérhető, beszerezhető legyen

3. A tenyészet genetikai tulajdonságai

- Ismert genetikai összetétel
- Ismert genetikai történet (norvég patkány, *Escherichia coli*)

4. Érzékenysége

- Relatív érzékenység a toxikus szennyezőanyagra
- Speciális érzékenység egy vagy több szennyezőanyagra
- Széles spektrumú érzékenység

A tesztorganizmus: általános követelmények

5. Mennyire reprezentálja az ökoszisztémát

- Érzékenysége legyen jellemző rendszertani egységére
 - Lehet a legérzékenyebb
 - Érzékenyebb, mint az ökoszisztéma átlaga
 - “átlagos” érzékenységű
- Milyen rendszertani egységet (család, stb.) reprezentál

6. Koncentráció - válasz összefüggés

- A válasz legyen arányos a toxikus anyag koncentrációjával
- A hatásos koncentrációtartomány széles legyen

7. A teszt ismételhetsége, statisztikája

The background features a series of overlapping, wavy, ribbon-like shapes in various shades of green and light green, set against a white background. The shapes flow from the top left towards the bottom right, creating a sense of movement and depth. The text is centered within a white, semi-transparent horizontal band that spans across the middle of the image.

Egy fajt alkalmazó talajtesztek

Bakteriális tesztek talaj vizsgálatára

▪ Biokémiai, fiziológiai változások

- *Aliivibrio fischeri* lumineszcencia gátlási teszt (laborgyakorlat)
- *Azomonas agilis* dehidrogenáz enzimaktivitás gátlási teszt

▪ Túlélés, pusztulás

- *Bacillus subtilis* teszt, agardiffúziós módszerrel
- *Pseudomonas fluorescens* toxicitási teszt (MSZ 21470-88, talajkivonat, indikátor: TTC)

▪ Géntoxikológiai tesztek – mutáció

- Ames-teszt (*Salmonella tiphymurium*)
- Mutatox-teszt (*Vibrio fischeri* nem világító variáns, mutagén hatásra lumineszcencia)...

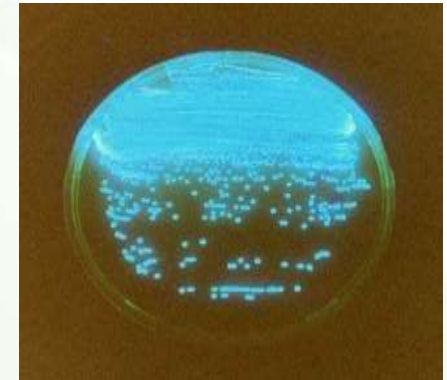


Aliivibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt I. (Laborgyakorlat)

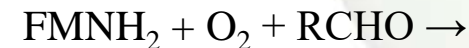
- *Aliivibrio fischeri*: fényt emittáló tengeri baktérium
- **Érzékenysége**: mind toxikus fémekre, mind szerves makro- és mikroszennyezőkre érzékeny.
- **Végpont**: lumineszcencia intenzitáscsökkenése, a minta hígítási sorából EC₂₀, EC₅₀ határozható meg.
- **Szükséges műszer**: luminométer.
- **Tesztelés időtartama**: 30 perc.
- **Szabvány módszerek**: US EPA Microtox, DIN 38412, teljes talajra adaptált és direkt kontaktra kidolgozott változat: BME-MGKT.



LUMAC luminométer



Bakteriális lumineszcens fény képzésének alapegyenlete:



(FMNH₂ a redukált míg a FMN az oxidált flavin mononukleotid)



Aliibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt II.

- A mérés kivitelezés során 2 % NaCl koncentráció fenntartása szükséges (tengeri baktérium).

- Érzékenység mérése:

- Cu-kalibráció sor,

- végeredmény megadása réz-egyenértékben

- segíti a környezettoxikológiai eredmények összehasonlítását
- hatáson alapuló határértékekhez viszonyítható

- Kontroll:

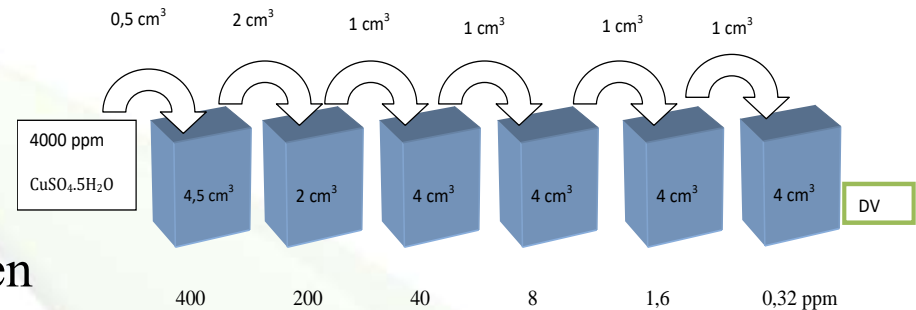
- Folyadékmintáknál – desztillált víz, NaCl

- Szilárd fázisú mintáknál OECD vagy szennyezetlen kontroll talaj (mintához fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságaiban hasonló talaj)

- célja: mintaszuszpenzió zavarosságának figyelembe vételéhez

- Minta:

- hígítási sor az EC_{20} és EC_{50} értékek meghatározásához

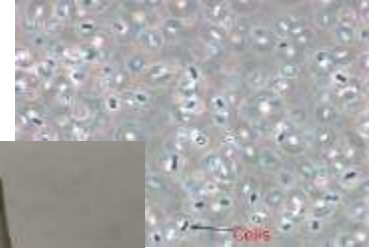


Azomonas agilis dehidrogenáz enzimaktivitás gátlási teszt I.

- **Az *Azomonas agilis* érzékenysége:** a szennyezőanyagok széles skálájára érzékeny tesztorganizmus. Túlságosan is érzékeny, így a teszt során, a szennyezőanyag toxicitásán kívüli okok is okozhatnak gátlást. Screenelésre, a negatív minták kiszűrésére javasolható.
- **Végpont:** dehidrogenáz aktivitás megléte vagy hiánya, illetve csökkenése, a hígítással: EC₂₀, EC₅₀
- **Szükséges műszer:** vizuális (alternatív elektronakceptor színének megjelenése: igen, nem), vagy fotométer (alternatív elektronakceptor színintenzitása)
- **Tesztelés időtartama:** 48 óra
- **Szabványosított módszerek:** MSZ 21978/30 (veszélyes hulladékok kivonatára), talajra adaptált, direkt kontaktra illetve talajszuszpenzióra kidolgozott változatát a BME ABÉT-n fejlesztettük ki.

Azomonas agilis dehidrogenáz enzimaktivitás gátlási teszt II.

- Környezeti stressz → az elektrontranszport rendszer megsérülhet. Az elektrontranszport lánc első szakaszának lépéseit a dehidrogenáz enzim katalizálja.
- Alternatív elektronakceptor: TTC (2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid), mely az elektrontranszport-lánc zavartalan működése esetén redukálódik, és piros színű trifenil-formazánná alakul.
- Toxikus anyagok jelenlétében a dehidrogenáz enzimaktivitás gátolt.
- Minta: steril talaj, hígítási sor (ha más mikrobák kerülnek a tesztoldatba, azok dehidrogenáz aktivitása meghamisítja az eredményt)
- Referencia: réz hígítási sorozat



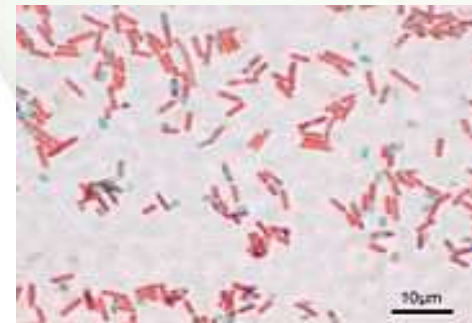
http://www2.pharm.u-szeged.hu/phtech/kutatas/kutatas_muszer_altalanos_hu.html

Bacillus subtilis teszt, agardiffúziós módszerrel I.

- **Tesztorganizmus:** BME-en a gyöngyösoroszi Pb és Zn bánya területén izolált, fémekre érzékeny törzs
- **Érzékenysége:** közepesen érzékeny talajbaktérium, elsősorban toxikus fémekre, mint Zn, Cd, Cu érzékeny
- **Végpont:** növekedés-gátlás, kioltási zóna formájában, hígítási sor kioltási zónáiból EC_{50}
- **Kiértékelés:** vizuális
- **Tesztelés időtartama:** 48-72 óra



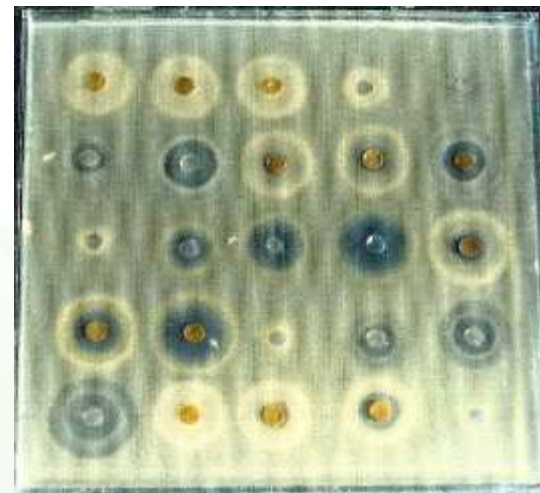
<http://sites.google.com/site/scienceprofonline/cellbiologyhelp104>



http://wikidoc.org/index.php/Bacillus_subtilis

Bacillus subtilis teszt, agardiffúziós módszerrel II.

- Agaros táptalajban egyenletesen eloszlott és lemezként kiöntött *Bacillus subtilis* szaporodását, a lemez felületére helyezett, agarral szilárdított talajmintakorong toxicitásától függően gátolja.
- A mintakorong körül kialakult kisebb denzitású zóna → toxicitás
- Oldat: a kisebb denzitású zóna átmérője → szennyezőanyag mennyisége
- Teljes talajminták: a módszer kvalitatív természetű (toxikus, nem toxikus)
- Elővizsgálat, a negatív minták kiszűrése
- Napi akár 500 minta



A minták a következő négy csoportba sorolhatók:

kioltási zóna → *erős gátlás*

→ **toxikus minta**

gyengítési zóna → *gyenge gátlás* →

gyengén toxikus minta

nincs zóna → *nincs gátlás*

→ **nem toxikus a minta**

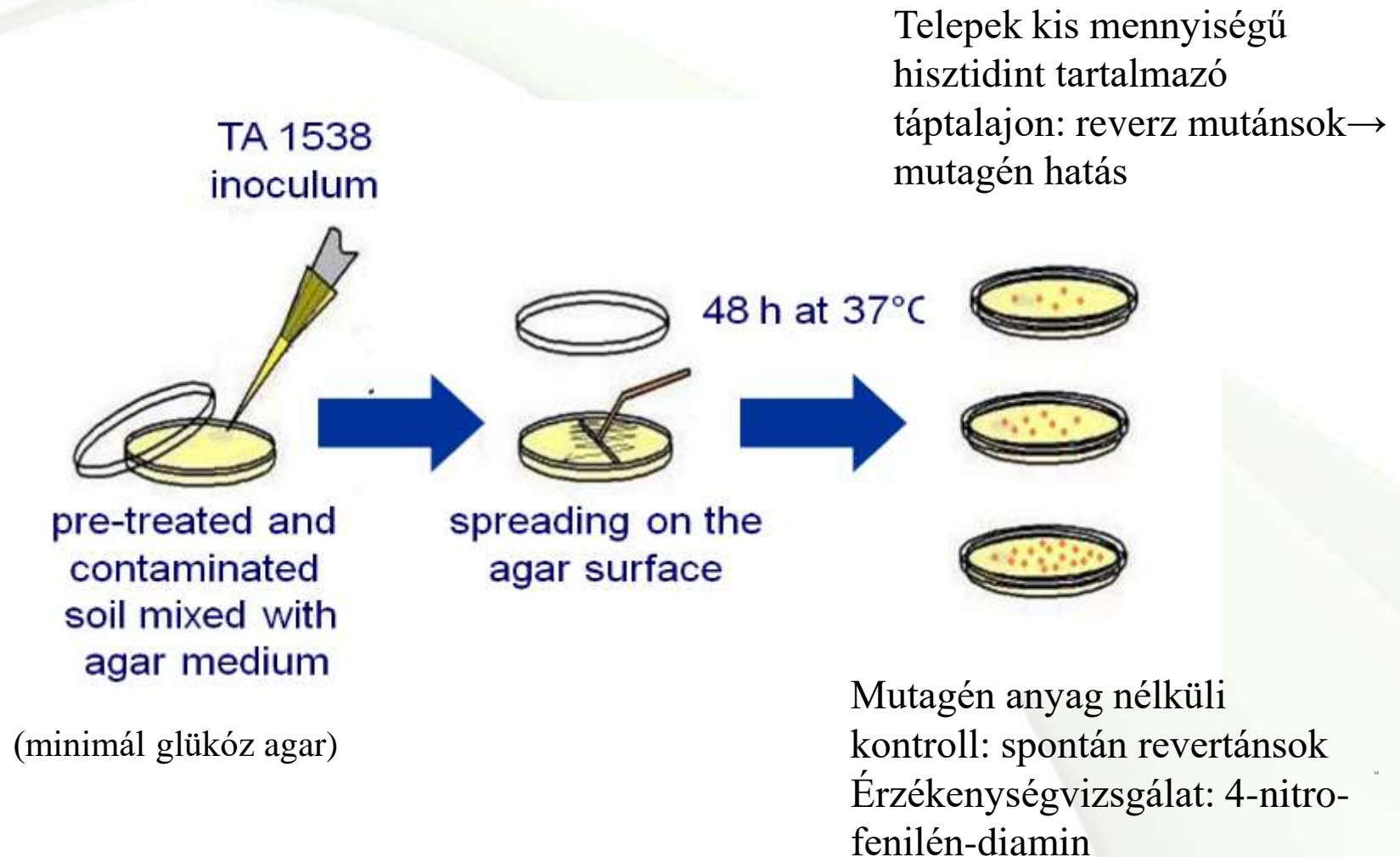
serkentési zóna → *serkentő hatás* →

nem toxikus a minta

Ames mutagenitási teszt talajra I.

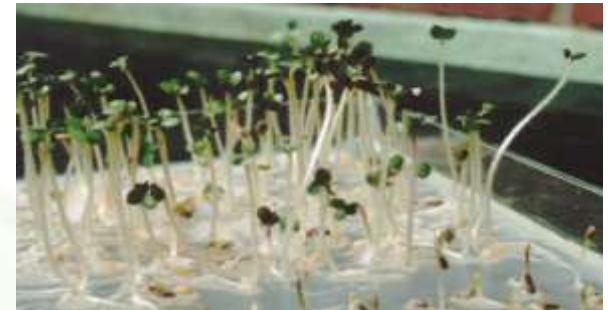
- **A teszt típusa:** egy fajt alkalmazó, reverz mutagenitási teszt, géntoxicitás kimutatására
- **Tesztorganizmus:** *Salmonella typhimurium* mesterségesen hisztidin auxotróffá tett törzsei: TA 1535, TA 1537, TA 1538...stb.
- **Végpont:** a hisztidin termelő képesség visszanyerése: hisztidin-mentes táptalajon revertáns telepek megjelenése
- **Időigény:** 48–72 óra
- **Szabvány:** ISO 16240:2005 szabvány vízminősítésére, OECD 471 vegyi anyagok tesztelésére, BME ABÉT-en direkt kontaktra

Ames mutagenitási teszt talajra II.



Növényi tesztorganizmusok

- Magasabb rendű növények
 - Többnyire egynyári növények és fűfélék
 - Pusztulás
 - csírázásgátlás – nem mindig elég érzékeny, mag belső tartalékainak hasznosítása
 - Növekedés
 - gyökér- és szárnövekedés gátlása
 - Fotoszintetikus enzimaktivitások
 - klorofill mérése
 - Metabolikus enzimaktivitások
 - pl. peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, glutation-S-transzferáz
 - Szimbiotikus nitrogén-megkötés



Sinapis alba (fehér mustár) gyökér- és szárnövekedés gátlási teszt

- *Sinapis alba* érzékenysége: a szennyezőanyagok széles skálájára érzékeny.
- **Végpont:**
 - csírázásgátlás,
 - szár- és gyökernövekedés gátlás,
 - ED₂₀ és ED₅₀ a minták hígítási sorozatából,
 - nedves és száraz biomassza tömeg.
- **Szükséges műszer:** vonalzó, vizuális értékelés.
- **Tesztelés időtartama:** 72 óra.
- **Szabványosított módszerek:** MSZ 21976-88 kivonatra, teljes talajra adaptált, direkt érintkezésre kidolgozott változat: BME ABÉT



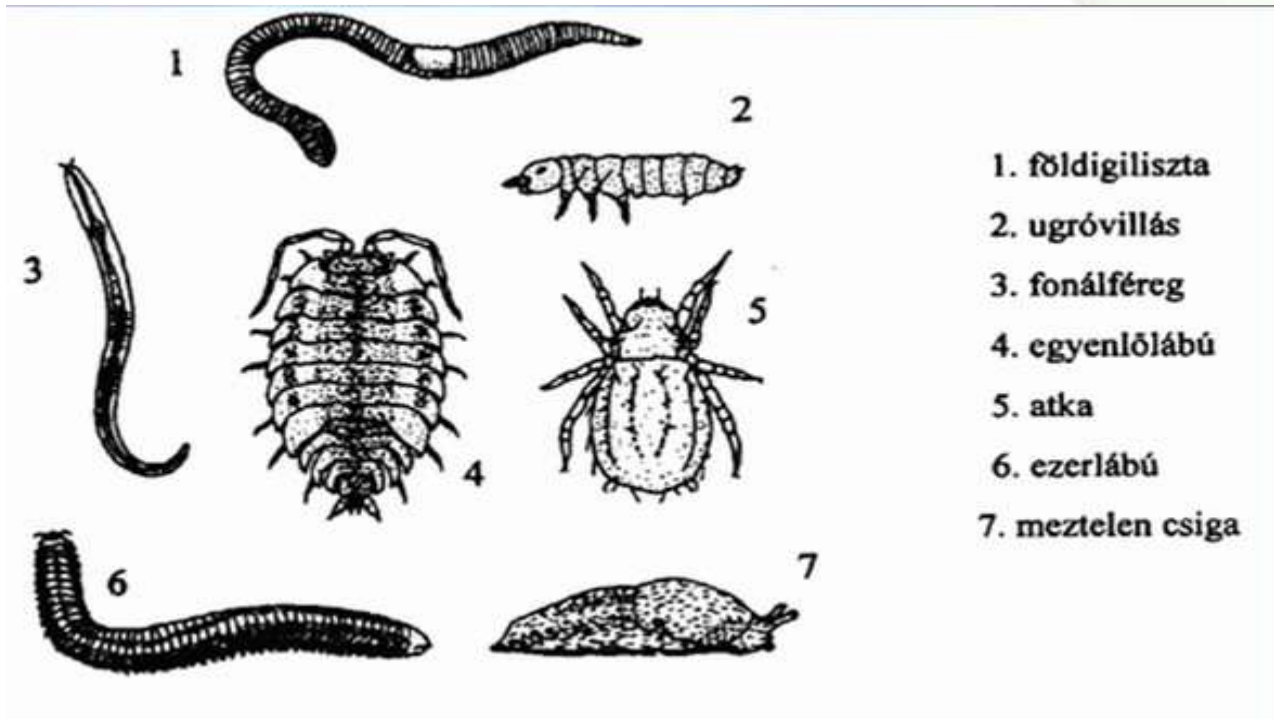
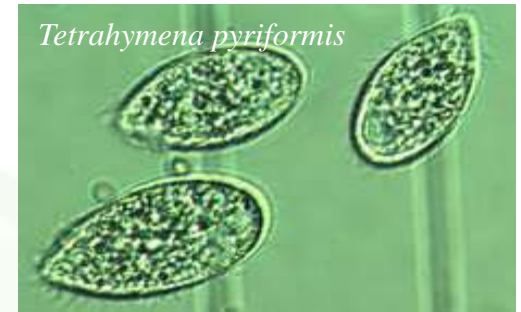
Állati tesztorganizmusok

- Egysejtű állatok

- Protozoák: *Tetrahymena pyriformis*, *Colpoda cullus*, *Paramecium aurelia*

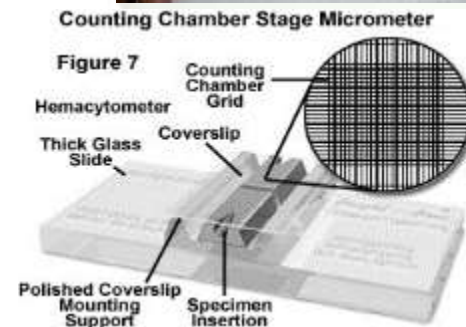
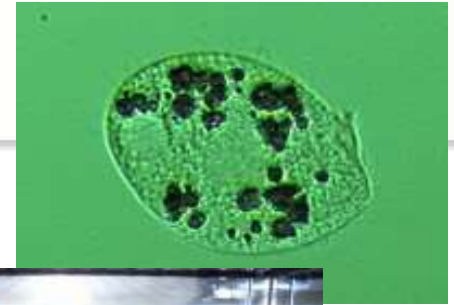
- Többsejtű állatok

- Elsősorban talajlakó állatok



Tetrahymena pyriformis szaporodás gátlási teszt

- *Tetrahymena pyriformis* nagyon érzékeny, talaj pórusvizében élő protozoa. A talajok toxikus hatása → állatok számának (sejtszám) változása.
- Talajminta: szárított, porított, szitált, steril
- Tápoldat: PP táp + antibiotikumok
- Inkubálás: szobahőmérsékleten (20–25 °C-on), sötétben, 100 rpm-mel rázatva
- A sejtszámot 72 óra alatt többször meghatározzuk mikroszkópos sejtszámlálással: Bürker-kamrával
- A szaporodási görbe exponenciális szakaszára illesztett görbe meredekségét hasonlítjuk össze a szennyezetlen kontrolléval.



Eisenia fetida (földigiliszta) teszt I.

- ***Eisenia fetida* érzékenysége:** közepesen érzékeny .
 - Az expozíciós útvonalak: bőrkontakt és az emésztés
 - Akut hatásokkal szemben ellenállóbb, a krónikus toxicitás és a reprodukció nagyobb érzékenységet biztosít.
- **Végpontok:**
 - akut és krónikus toxicitás esetében: az állatok száma, letalitás, hígítással EC_{20} és/vagy EC_{50} , valamint NOEC
 - reprodukciós vizsgálatoknál: az utódok száma, NOEC
 - bioakkumuláció vizsgálata esetén: koncentráció a szövetekben.
- **Szükséges műszer:** állatok száma: manuális és vizuális, bioakkumuláció vizsgálata esetén a szennyezőanyagok megfelelő analitikai műszer
- **Időigény:**
 - szűrőpapír teszt talajkivonattal (OECD, 1984) esetén 24 és 48 óra
 - mesterséges talajteszt OECD talajba kevert minta-szuszpenzióval (OECD, 1984; EEC, 1982) esetén 7 és 14 nap



Folsomia candida (Collembola) mortalitási teszt I. (Laborgyakorlat)

- ***Folsomia candida***: ugróvillások rendjébe tartozó, talajlakó, ősi rovar
- **Teszt típusa**: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, állati, akut toxicitási és krónikus (reproduktivitási) teszt. Mikrokozmosz tesztként is alkalmazható.
- **A *Folsomia candida* érzékenysége**: fémekre kevésbé, szerves szennyezőanyagokra érzékeny, főleg az illékonyakra és a bőrön át felszívódókra.
- **Végpont**: állatok száma: letalítás, hígításból LC_{20} és LC_{50} , reproduktivitási teszt alapján NOEC.
- **Szükséges műszer**: citoplaszt mikroszkóp vagy vizuális
- **Tesztelés időtartama**: akut: 5–10 nap, reprodukciós: 20 nap
- **Szabvány**: ISO 11267:1999, OECD/OCDE 232



Folsomia candida (Collembola) mortalitási teszt II.

- A vizsgálathoz azonos korú (14 napos) állatkákat kell felhasználni, ezért szükséges a szinkron populáció létrehozása.
- A teszthez 20–20 g légszáraz talaj- vagy üledékminta szükséges.
- ED₂₀ és ED₅₀ meghatározása céljából, a mintákból hígítási sort készítünk (OECD standard talajt)
- A mintákat 5–5 ml vízzel megnedvesítjük + 2–2 mg élesztő.
- Az üvegekbe 10–10 db állatkát juttatunk
- Inkubálás: 7 napig sötét, 20–25°C-os helyen
- A kiértékelés: a talajt vízzel felszuszpendáljuk
- A felszínen úszkáló állatkákat megszámloljuk.
- A megmaradt illetve elpusztult állatkák számából következtetünk a vizsgált minta toxicitására.
- A hígítási sorból kapott értékeket (megmaradt állatok darabszáma) a hígítás tömegarányának függvényében ábrázoljuk.



OECD talaj:
tőzeg (10%),
kaolinit agyag (20%),
ipari kvarc homok (70%)



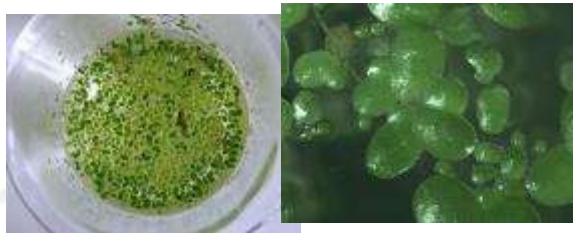
**Egy fajt alkalmazó tesztek – vízi
ökoszisztéma tesztelése**

Vízi ökoszisztéma tesztelése egy fajt alkalmazó tesztek

- Vízi ökoszisztéma tesztelése ↔ szárazföldi ökoszisztéma tesztelése
- Sok, elterjedt szabvány módszer
- Széles körben alkalmazott tesztorganizmusok
 - Algatesztek
 - Békalencseteszt
 - Daphniateszt
 - Haltesztek
 - FETAX
 - Fejlesztés alatt álló, nem szabványosított módszerek



Vízi tesztorganizmusok környezettoxicológiai tesztelésre



← Békalencse: *Lemna gibba*

Protozoa: *Tetrahymen pyriformis* (állati egysejtű)

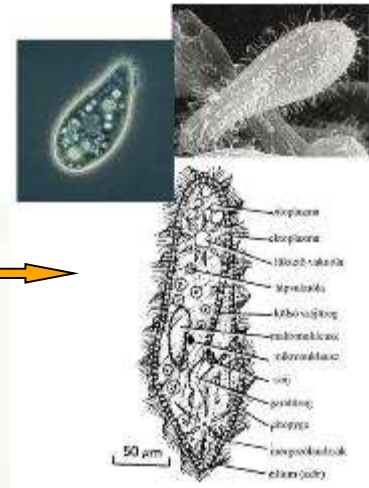


↑
Vízibolha: *Daphnia magna*

Halteszt



Guppi: *Poecilia reticulata*



Algatesztek



- Az **algák** használata a vízi rendszerek ökotoxikológiai vizsgálatára általánosan elterjedt.
- Az ***alga növekedési teszt*** a toxikus vegyi anyagoknak az elsődleges termelők anyagcsere-folyamataira gyakorolt gátló hatását vizsgálja. Édesvízi és tengeri algákat használhatunk tesztorganizmusként.

Az ASTM (American Society for Testing and Materials) ajánlásai:

Édesvízi algák

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

Tengeri algák

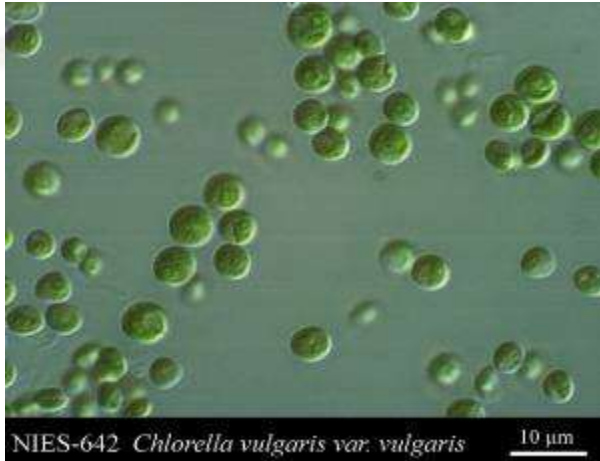
- Kovamoszatok: *Skeltonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*
- Ostoros moszatok: *Dunaliella tertolecta*

Algatesztek - édesvízi algák az ökotoxikológiában (Calow, 1993)

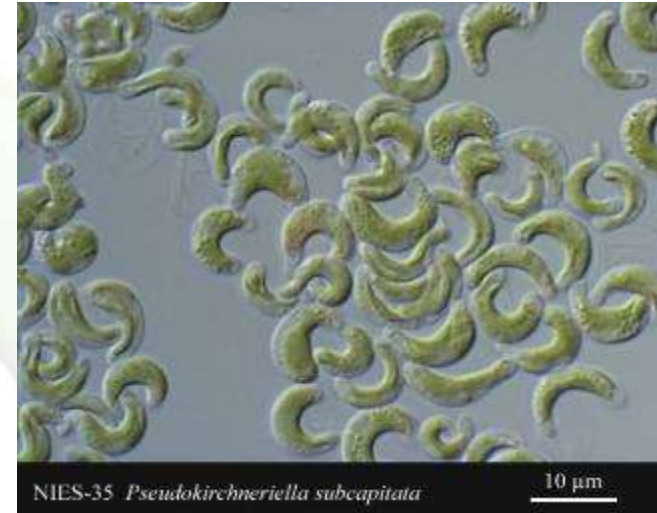


Vizsgált vegyület	Tesztorganizmus	A teszt időtartama
Tiszta vegyületek	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Navicula seminulum</i>	5 nap
Növényvédőszer	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Navicula seminulum</i>	5 nap
Vízoldható vegyületek	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	3 nap
Tiszta vegyületek keveréke	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	4 nap
Humán és állati gyógyszerek	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	14 nap

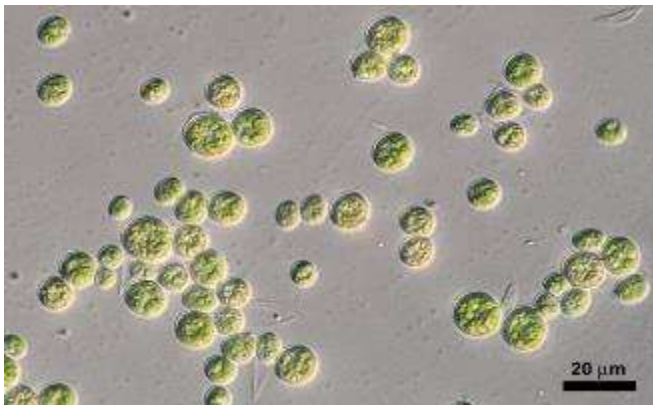
Édesvízi algák az ökotoxikológiában



Chlorella vulgaris mikroszkópos képe
(Alga Resource Database)



Pseudokirchneriella subcapitata mikroszkópos képe
(Alga Resource Database)



Scenedesmus subspicatus mikroszkópos képe
(Culture Collection of Autotrophic Organisms)

Algateszt – 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 vagy tengeri algafajok
- **Teszt végpontja:** szaporodásgátlás
- **Szükséges műszer:** mikroszkóp vagy fotométer
- **A teszt időtartalma:** 24-96 h (vagy hosszabb)
- **A teszt során felhasznált tenyészet kora:** A sejtszaporodás logaritmikus fázisában lévő tenyészet (kb. 6-8 napos)
- **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 algatenyésztettel

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

Békalencse



- A békalencsék a víz felszínén úszó egyszikű, légyszárú vízínövények.
- 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 jelez.
- *Lemna minor*, *Lemna gibba*



Békalencseteszt - kivitelezés



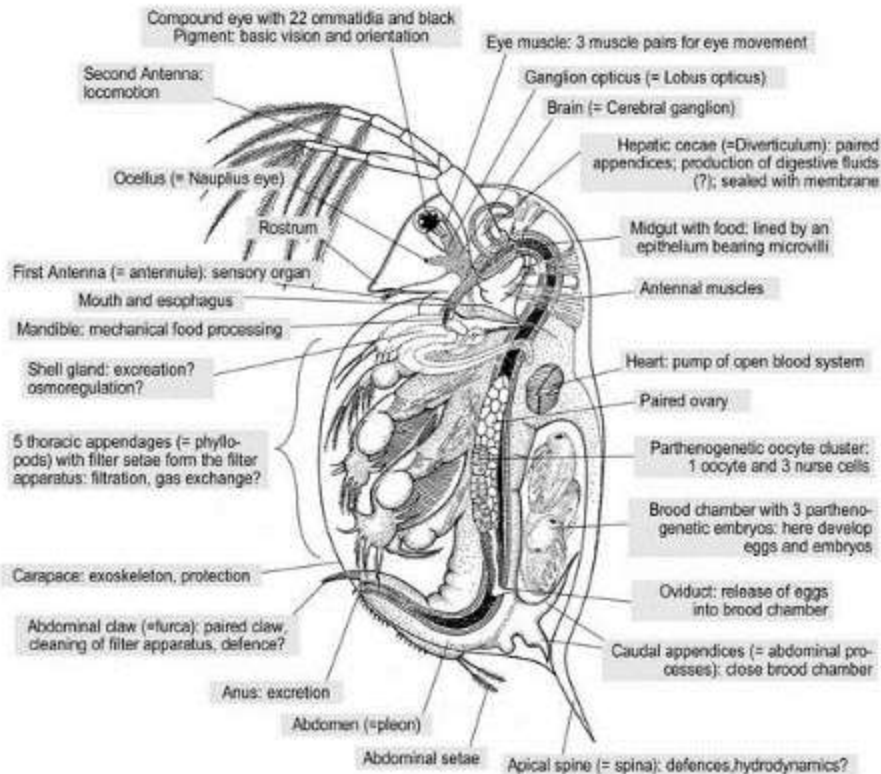
- Tesztoldatok: 150 ml-es *főzőpoharakba* a hígítási sor minden tagjából kiveszünk 1–1 ml-t és a békalencsék fenntartásához használt tápoldattal kiegészítjük 125 ml-re.
- Kontroll minták
- A tesztoldatok tetejére 10–10 darab kétlevelű, sérülésmentes zöld színű *békalencsét* helyezünk.
- Az összeállított mérőoldatokat 20–25 °C-os termosztátban *inkubáljuk* 7 napig megvilágítás mellett (8:16 órás sötét:világos ciklus, Daylite, 10.000 lux).
- A tesztelési idő alatt minden nap ugyanabban az időpontban *megszámoljuk* a békalencsék leveleinek számát.
- Értékelés: levélkeszám, levelek területe, klorofilltartalom

Békalencseteszt – a teszt jellemzői



- **Teszt típusa:** Egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, krónikus növényi teszt
- **Alkalmas:** Vízben oldható vegyi anyagok; felszíni vizek, talajvizek, szennyvizek toxikológiai vizsgálata.
- **Tesztorganizmus:** *Lemna minor*, *Lemna gibba*
- **Végpont:** levélkeszám, levelek területe, klorofilltartalom
- **Tesztelés időtartalma:** 7 nap
- **A teszt szabványosított formája:**
- A magyar szabvány előkészületben.
- 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

Daphnia



- A *Daphnia*, a vízibolha az egyik legelterjedtebb vízi tesztorganizmus.
- Két faja népszerű, mint ökotoxikológiai tesztorganizmus: a *Daphnia magna* és a *Daphnia pulex*.
- A *Daphnia magna* akár 5 mm-re is megnőhet, míg a *D. pulex* és *C. dubia* maximális mérete 2–3 mm.
- A Daphniák baktériumokat és élesztőt, algát is esznek.
- Víztisztítás fontos faktor.

Forrás: <http://www.evolution.unibas.ch/ebert/publications/parasitismdaphnia/ch2f1.htm>

Daphnia

- 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.



Daphnia születése

<http://www.youtube.com/watch?v=b7UFjsAYr3Y&feature=related>

Daphnia, akut teszt



- 10 db 24 óránál nem idősebb újszülött.
- Az állatkákat 100 ml tesztoldatot tartalmazó 125 ml-es edénybe helyezük. A tesztelendő vegyi anyag 5 különböző koncentrációját vizsgáljuk + a negatív kontroll és a referenciaanyag. (3 ismétlés)
- Végpontként a mozgásképtelenséget illetve mozdulatlanságot használjuk.
- A mérést 24 óra és 48 óra elteltével végezzük. Az akut teszt során nem etetjük az állatokat. Optimális hőmérséklet 20 °C, a megvilágító fény intenzitása 540 - 1000 lux közötti érték lehet, 16 órás megvilágítást 8 óra sötétség követ. A pH: 7,0-8,6 között változhat, az oldott oxigén koncentrációja 60-100 %.
- A 48 órás akut teszt jól alkalmazható „tisztá” vegyi anyagok veszélyességének felmérésére, vegyi anyagok keverékeire, szennyvizekre és más elfolyó vizekre, veszélyes hulladékokra.

Daphnia, krónikus teszt



- A 21 napos krónikus teszt: az állatok túlélésén kívül növekedésüket és szaporodásukat is vizsgálhatjuk.
- Az állatok etetéséről gondoskodni kell.
- Szakaszos vagy folytonos. A szakaszos kísérletet rendszeresen frissíteni kell.
- A folyamatos átfolyást biztosító kamra előnye, hogy hígítással állandó összetételű és minőségű közeget produkál, nem kell frissíteni.
- A krónikus teszt szintén 10 állatot alkalmaz, minimum 2 ismétlésben, 100 ml-es edényben 80 ml tesztoldattal, 21 napon keresztül.
- A végpontok a túlélés, a növekedés és a szaporodás.

Daphniateszt – a teszt jellemzői



- **Teszt típusa:** Egy fajt alkalmazó, akut v. krónikus toxicitási teszt
- **Tipikus alkalmazási területe:** Vízben oldható vegyi anyagok; felszíni vizek, talajvizek, szennyvizek toxikológiai vizsgálata
- **Tesztorganizmus neve:** *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* és *Ceriodaphnia dubia*
- **Teszt végpontja:** Immobilizáció, túlélés, növekedés, szaporodás
- **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. Daphniateszt

MSZ 21978-13:1985 Veszélyes hulladékok vizsgálata. Daphniateszt

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

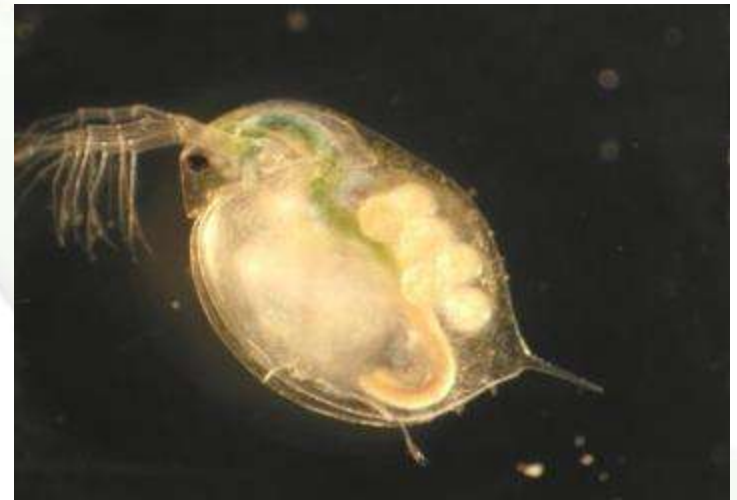
MSZ ISO 10706:2002 Vízhminőség. Anyagok hosszú távú mérgező hatásának meghatározása *Daphnia magna* Strauson (*Cladocera*, *Crustacea*)

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

Daphnia, szívritmus mérése



- Szívritmus mérése: új mérési végpont
- Érzékenyítés
- Kutatási eredmények:
 - koffein, nikotin,
 - Gyógyszerhatóanyagok...



Daphnia szívritmus mérése

<http://www.youtube.com/watch?v=MJCnZ0pB3q4&feature=related>

Haltesztek 1.



- Kiterjedten használják vízi ökoszisztémák érzékenységének jellemzésére, a vízi ökoszisztémát veszélyeztető vegyi anyagok hatásának vizsgálatára.
- Általánosan elterjedt a peszticidek és más ipari és mezőgazdasági vegyi anyagok hatásának mérésére, valamint szennyvizek, elfolyók és veszélyes hulladékok vizsgálatára.
- A legnépszerűbb édesvízi teszthalak a *Pimephales promelas*, a *Lepomis macrochirus*, az *Ictalarus punctatus* és az *Oncorhynchus mykiss*.



Guppi: *Poecilia reticulata*



Zebradánió: *Brachidanio rerio*

Haltesztek 2.



- A tesztállatok: korban és méretben azonos egyedek. Fiatal állatok, melyek tömege fajtól függően 0,1-5,0 g lehet. A leghosszabb hal hosszmérete ne legyen nagyobb, mint a legrövidebb kétszerese.
- A **tesztedény** méretaránya adott.
- A **tesztoldat** legalább 150 mm mély legyen a 0,5 g-nál nagyobb tömegű halak számára, és legalább 50 mm mély a 0,5 g alattiak esetében.
- A teszt **időtartama** statikus teszt esetén 96 óra, hosszabb idejű teszteknel legalább 96 óránként frissítésre van szükség, vagy átfolyásos megoldásra.
- A víz **hőmérséklete** fajtól függően 12 °C-tól (*O. mykiss*) 25 °C-ig (*P. promelas*) változhat.
- A víz **pH-ja** a vízkeménységtől és a fajok igényétől függően 6,5 és 8,5 között változhat. A megvilágítás: a 16 órás megvilágítást 15-30 perc átmenettel 8 órás sötétség kövesse.
- Az **oldott oxigén** koncentráció 60-100 % között változhat.
- Végpontként** a pusztulás vagy a mozgásképtelenség mérhető.

Teratogenitás vizsgálata békaembrióval (FETAX)



- A teratogenitási tesztek: az utódokban jelentkező fejlődési rendellenességeket vizsgálják, amely megmutatkozhat az embrió pusztulásában, gátolt növekedésében és fejlődésében, valamint fenotípusban is jelentkező fejlődési rendellenességekben.
- Az embriók érzékenyebbek, mint a kifejlett egyed.
- A természet általában többszörös védelemmel látja el az embriókat, de a békaembriók a szabadban fejlődnek.
- A *Xenopus laevis* békafaj az emberre is extrapolálható eredményt ad. Jól ismert kísérleti állatfaj, széles körben használják genetikai és fejlődésgenetikai vizsgálatokhoz.
- Laboratóriumi körülmények között jól tenyészthető és fenntartható, egyszerre sok utódot hoz létre, így a kísérletekhez és mérésekhez megfelelő számú egyed áll rendelkezésünkre.

Teratogenitás vizsgálata békaembrióval (FETAX)



- A FETAX - gyorseszteszt.
- Segítségével veszélyes hulladékok valamint tiszta és keverék vegyi anyagok teratogén hatása tesztelhető.
- Ökotoxicitás pontos előrejelzésére is alkalmas, hiszen a gyanúsított anyagok már sokkal kisebb koncentrációban hatnak a békaembriókra, mint a felnőtt, kifejlett egyedekre.
- A FETAX módszert a teratogenitás szűrésére és kizárására lehet a legjobban használni, negatív eredmény esetén.



<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/fetax2000/FETAX.jpg>

Teratogenitás vizsgálata békaembrióval (FETAX) - a teszt kivitelezése



- Minimum 2 éves felnőtt hímekre és 3 éves nőstényekre van szükség. A felnőtt hím 7,5-10 cm hosszú, a nőstény 10-12 cm hosszú.
- A tesztedény egy nagyméretű akvárium a tenyésztésre szánt felnőttek számára, legalább 30 cm magas, 20-30 liter térfogatú, buborékoltató levegőztetéssel. Egy 40x40 cm-es akváriumban 4-6 egyed élhet.
- Az embriókat Petri-csészében tartjuk és a tesztelést is abban végezzük. 10 ml tesztelegyenben **25 embrió**t helyezünk a vizsgálathoz. Az embriók a tesztelendő vegyi anyagnak állandóan, végig a teszt alatt ki vannak téve. A tesztelendő anyagot naponta ismételten alkalmazzuk. A teszt időtartama 96 óra. A koncentrációk száma 5, az ismétléseké legalább 2.
- A tesztközeg hőmérséklete a felnőtteknél átlagosan 23 °C, az embrióknál 24 °C. 12 órás megvilágítást 12 órás sötétség követ.
- A végpont az akut tesztnél a pusztulás, a szubakut vizsgálatnál a teratogenitás.

Teratogenitás vizsgálata békaembrióval (FETAX) - alkalmazások

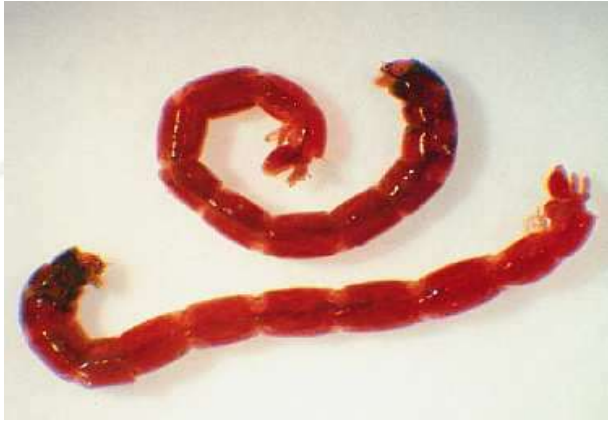


- Ammónium-perklorát hatása (Oklahoma State University, 2008)
- Időtartam: 4 nap
- Végpont: növekedés, fejlődési rendellenességek
- 1 mg/L – fejlődési rendellenesség
- 2000 mg/L – 50 % reprodukтивitás csökkenés



<http://www.serdp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Risk-Assessment/ER-1236>

Árvaszúnyoglárvá teszt



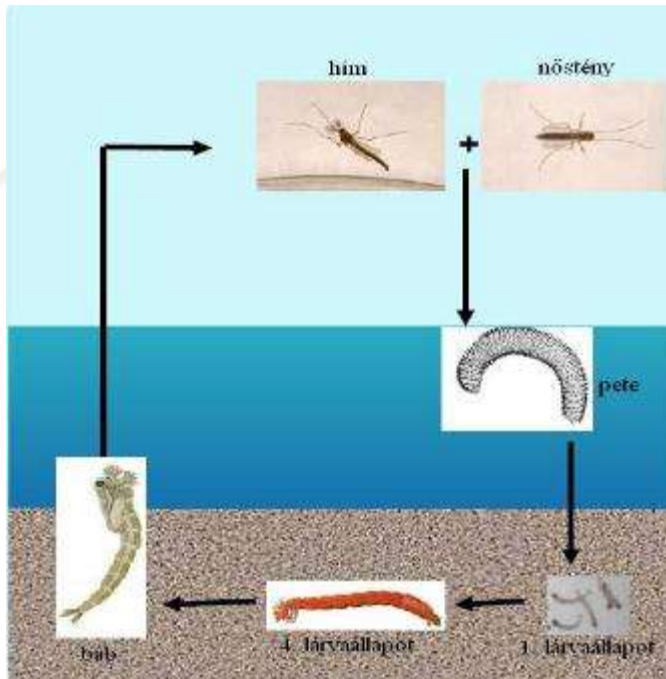
Árvaszúnyog lárvá



C. riparius hím imágó

- *Chironomus riparius*
- Az árvaszúnyogok (*Chironomidae*) közeli rokonai a szúnyogoknak. Hosszúlábú állatok, magaspúpú, csuklyaalakúan előrenyúlt torrészlettel és karcsú lábakkal.
- A rovarok osztályán belül található *Chironomidae* családban található a legtöbb és ökológiai szempontból legfontosabb faj. A világszerte elterjedt árvaszúnyog a vízi táplálékláncban kiemelkedő szerepet játszik, mivel számos gerinces és gerinctelen állatnak fontos táplálékforrásként szolgál.

Árvaszúnyoglárvá teljes életciklus teszt



Az árvaszúnyogok életszakaszai

- Az árvaszúnyog teszt előnye, hogy a tesztorganizmusok könnyen kezelhetők és fenntarthatók, viszonylag rövid életciklussal (3-4 hét) rendelkeznek, ivaros szaporodásuk miatt vegyületek endokrin rendszer károsító hatása vizsgálható.
- A gerinctelen állatok közül a rovarok endokrin rendszere ismert a legjobban, a két nem egyedei könnyen megkülönböztethetők egymástól.

Az FLC teszt robosztus, populáció-releváns végpontokat állít fel, amik használhatók a mezőgazdaságban alkalmazott vegyszerek kockázatfelmérése során.



Árvaszűnyoglárvá teljes élelciklus teszt

- Különböző expozíciós útvonalak vizsgálhatók; mind a szennyezett vizek, mind a szennyezett üledékek tesztorganizmusokra gyakorolt hosszútávú hatása tanulmányozható.
- Az FLC teszt nem ér véget az imágó bábból való kikelésével, hanem azok (szülői generáció, P) összegyűjtése és tenyész-ketrecbe engedése után a következő utód generáció (F1) egyedei révén vizsgálja a szaporodási képességet, a termékenységet.
- Azokat a tojásokat, amikből a későbbi utód generáció alakul ki ugyanolyan szennyezett víz-üledék rendszerben tartják fejlődésük során, mint a szülői generációt.
- Két generációt ölel föl (P és F1), az alábbi plusz információkat szolgáltatva ezzel: másodgenerációs végpontok (az akkumuláció, továbbörökített hatások, stb eredményeként érzékenyebb generáció) reprodukciós képesség, termékenység felmérése.



Microbiotesztek

- Környezeti minták ökotoxicitásának vizsgálata: törzstenyészet fenntartása. Nehézkes és időigényes feladat: az állománynak ugyanis ellenőrzött és állandó érzékenységűnek kell lennie.
- A tenyészet fenntartása kiküszöbölhető tartósított tesztszervezetek felhasználásával, ún. mikrobiotesztek alkalmazásával.
- A Ghenti Egyetemen a LABRAP (*Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution*) kifejlesztett toxkitek.
- A tesztek közös jellemvonása, hogy a tesztszervezeteket immobilizált vagy alvó formában lehet tárolni, életképességüket fél-egy évig megőrzik, tesztszervezettől függően.
- Ezeket meghatározott körülmények közé helyezve kikeltethetők, a teszt gyorsan, alacsony költség- és időráfordítással elvégezhető.

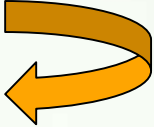
<http://www.microbiotests.be/>



REACH → OECD tesztek

- REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
- EU-ban 2007. júniusától él, és 2008. júniusában hatályba lépett a vegyi anyagok bejelentését, értékelését, korlátozását és engedélyezését szabályozó rendelet.

A vegyi anyagok gyártásából és használatából adódó kockázatokat egy komplex rendszerben kell menedzselni.

- A REACH feladata, hogy minden évi 1 tonna fölött gyártott, importált vagy használt, kereskedelmi forgalomba hozott vegyi anyagot regisztráljon Európában, felmérje ezek kockázatát és az eredmény birtokában osztályozza és címkézza a vegyi anyagokat és ha szükséges kockázatcsökkentési intézkedést, pl. korlátozást vagy tiltást rendeljen el.
- REACH rendelet végrehajtója és közreműködője az ECHA → RAC bizottság
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) : 
Guidelines for the Testing of Chemicals

OECD guidelines for testing chemicals

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) : Guidelines for the Testing of Chemicals

- http://www.oecd.org/document/7/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- http://www.oecd-ilibrary.org/content/package/chem_guide_pkg-en
- Vegyi anyagok hatásának tesztelése
- REACH rendelet

IRODALOM

- Gruiz Katalin, Horváth Beáta, Molnár Mónika: **Környezettoxicológia: Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára.** Műegyetemi Kiadó, 2001 (ISBN 963 420 676 x)
- Landis, W.G. and Yu, M.H. (2003) Introduction to Environmental Toxicology: impact of chemicals upon ecological systems, 3rd. Edition. CRC Press LLC, New York, Boca Raton, Florida
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1981) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris
- KÖRINFO adatbázis www.korinfo.hu