

A kutatás előzményei feltárták a talajlakó fonálféreg cönózisainak érzékenységét egyes szennyező mikroelemek iránt, de nyitva hagyták a különböző fonálféregcsoportok érzékenységi viszonyainak, illetve egyes elemformák hatásainak specifikus hátterére vonatkozó kérdéseket. Pályázatunk célja ezen mechanizmusok némelyikének megismerése volt. Ezért laboratóriumi kísérleteket hajtottunk végre különböző nehézfémek és hatóanyagformáik felvételi és leadási mintázatainak, valamint az ezek által előidézett mortalitási viszonyoknak a vizsgálatára. Az eredetileg tervezett mikroskálás kutatások céljára a terepi mintavételi helyek alkalmatlannak bizonyultak, ugyanis a területeken korábban elvégzett szennyezések hosszú távú hatásai lényegében kimutathatatlaná váltak. Ennek következtében egyrészt laboratóriumi vizsgálataink körét bővítettük újabb xenobiotikumok (pl. nano szerkezetű anyagok) bevonásával. Másrészt nagyobb hangsúlyt fektettünk az alkalmazott mikroanalitikai eljárásokra.

A kémiai analízisekben az alábbi újszerű megközelítéseket alkalmaztuk:

- 1.) Egy TXRF alapú módszer kifejlesztése révén kiküszöböltük az analíziseknek a fonálféreg kis egyedi biomasszájából adódó nehézségeit és sikeresen vizsgáltuk egyes nehézfémek felvételét.
- 2.) XANES technika segítségével, a BESSY II szinkrotron BAMline sugárnyalábját alkalmazva végeztük el egyes elemformák (Cr(III) ill. Cr(VI)) speciációját, továbbá vizsgáltuk az aktuális elemek kétdimenziós eloszlását, valamint a réz, a króm illetve a cink kémiai környezetét a kezelt fonálféreg testében.
- 3.) A FIB-SEM technika alkalmazásával vizsgáltuk egyes xenobiotikumok (réz, króm, cink) és esszenciális elemek (foszfor, kén) térbeli eloszlását a kezelt fonálféreg testében.

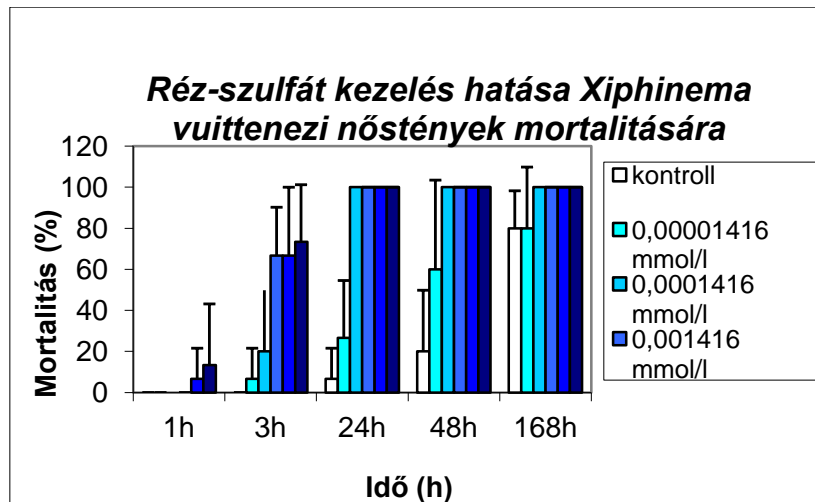
A pályázat keretében elvégzett kísérletes munka fontosabb eredményeit az alábbi bontásban ismertetjük: A.) ökotoxikológiai tesztek, B.) kémiai analízisek.

A.) Ökotoxikológiai vizsgálatok:

A kutatási terv E.2. pontjához illeszkedve igyekeztünk teszt-szervezetink körét kibővíteni az általánosságban használt r-stratégista baktériumevő fajoktól eltérő táplálkozási csoportok irányába is. Ennek keretében felkutattuk néhány nagy jelentőségű, K-stratégista életmenetű növényi táplálkozású, úgynevezett túfonálféreg faj (Longidoridae:Dorylaimida) hazai populációit, illetve begyűjtöttünk ezekből laboratóriumi fenntartás és tesztelés céljából: *Xiphinema vuittenezi* Luc, Lima, Weischer & Flegg, 1964, illetve *X. index* Thorne and Allen, 1950. A jelentésben tárgyalt kutatásokat a zömében ezen fajok alábbi populációjával végeztük: *X. vuittenezi* – Hűvösvölgy (Budapest), illetve Isaszeg, *X. index* – Pécs. A kifejlett *Xiphinema* nőtényeket a talajmintákból a Cobb-féle dekantálásos-szűrési eljárás egy módosított változatával nyertük ki. A teszteket 8*12 küvettát tartalmazó mikrotitráló lemezekben, desztillált vízben, illetve nagy tisztaságú (Milli-Q) vizes közegben végeztük el, miután egy előkísérlet során bizonyítást nyert, hogy ezen tesztközegek lényegesen kedvezőbben befolyásolják a mortalitást, mint a csapvíz, vagy a talajból nyert vizes kivonat (Baross, 2010).

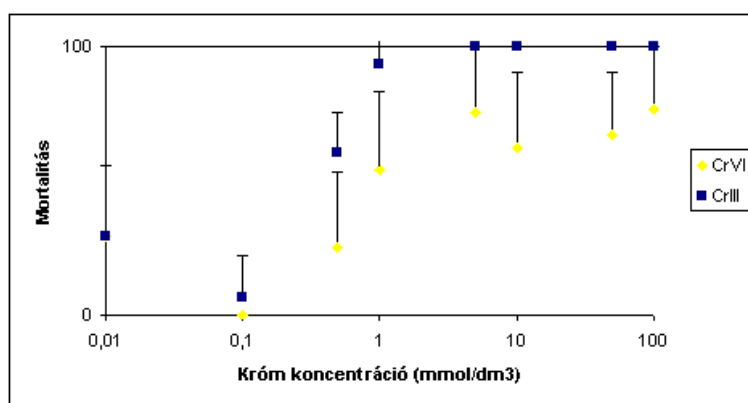
A kutatás első évében réz toxicitási tesztekkel végeztünk a *Xiphinema vuittenezi* faj kifejlett nőtényein, eltérő koncentrációjú réz-szulfát (CuSO₄) oldatokkal (1. ábra). A kapott

mortalitási adatok növekedést mutattak mind a koncentráció, mind az expozíciós idő növekedése mentén. Közelebről, bár a kezelés 1 óra után még nem okozott jelentős hatást, 3 óra után a hatás már erősen szignifikánsnak bizonyult ($p=0,0066$). Megjegyzendő, hogy a kontroll mortalitási viszonyai miatt a teszt 48 óra után már nem tekinthető érvényesnek. A kísérletek egy részében analitikai méréseket is végeztünk a rézzel kezelt állatokból.



1. ábra: Réz-szulfát koncentrációsorozat által előidézett mortalitás a koncentrációk és az idő függvényében (Takács (2013) nyomán).

A kutatás második évében különböző krómformák – Cr(III), Cr(VI) – toxikusságát teszteltük a *Xiphinema vuittenezi* növényi táplálkozású fonálféreg faj egyedein. Céljaink eléréséhez akut mortalitási tesztekét végeztünk a kifejlett nőstényeket kezelve a 0,01 – 100 mmol/dm³ (0,52 mg/L – 5,2 g/L) töménységi tartományba eső Cr(III)- illetve Cr(VI)-tartalmú oldatokkal (2. ábra). Eredményeink alapján a Cr(III) forma bizonyult jelentősen toxikusabbnak ($p < 0,01$), mivel itt a mortalitás már 5 mmol/dm³ (260 mg/L) koncentráció esetén elérte a 100%-ot, míg Cr(VI) esetén a legtöményebb 100 mmol/dm³ (5200 mg/L) kezelésben is csak 80% körüli mortalitást regisztráltunk. Ezek az adatok összhangban állnak a mikroanalitikai vizsgálatok eredményeivel, amelyek szerint a vizsgált koncentráció-tartományban az állatok Cr(III) felvétele jelentősen meghaladja a Cr(VI) felvételt. Mindez abban a tekintetben helyezi újszerű megvilágításba a kérdést, hogy rendszerint a hexavalens króm jelentősen toxikusabbnak bizonyul a trivalens formánál. A mi esetünkben ez ellenkezőleg történt, aminek a magyarázatát az elemfelvételi vizsgálatok során sikerült megtalálnunk.



2. ábra: Az egyes krómformák hatása *Xiphinema vuittenezi* nőstények mortalitására a kezelési koncentráció függvényében.

Vizsgáltuk egy másik mikroelem, a cink toxicitásának egy speciális, napjainkban még kevésbé ismert összefüggésrendszerét. Ennek keretében ZnO nanoszerkezetű részecskéinek ökotoxikológiai hatásait teszteltük, összehasonlítva a nagyszemcsés ZnO hatásaival, ugyanezen faj nőstényeire. A kísérlet során nano ZnO (Sigma-Aldrich, < 36 nm-es részecskeméretű) kezelőoldatot alkalmaztunk, 0,01, 0,1, 0, 10, 100, 1000 (mg/L) töménységben. Pozitív kontrollként nagyszemcsés ZnO (Sigma-Aldrich) 1000 mg/L töménységű oldata szolgált. A mortalitási tesztet 1 hetes inkubációs idővel végeztük. Eredményeink alapján a növekvő nano ZnO koncentráció növekvő toxicitást idézett elő. A nano ZnO kezelések esetében a toxicitás mértéke meghaladta mind a desztillált vizes kontroll közegben, mind a nagyszemcsés ZnO részecskéket tartalmazó közegben mutatkozó toxicitás mértékét és egy hét után már a 10 mg/L-es koncentrációjú kezelés is 100 %-os mortalitást okozott. Ezzel szemben a nagyszemcsés cink-oxid 1000 mg/L-es tesztelt koncentrációja mellett sem tapasztaltunk eltérő mortalitást a kontrollhoz képest.

A kutatás harmadik évében először kereskedelmi forgalomban kapható, a gyártó (Sigma-Aldrich) tájékoztatása szerint nano szerkezetű, különböző szemcseméretű cink-oxidot tartalmazó készítmények hatásvizsgálatát végeztük el. Az előzetes toxicitási tesztekben a nano szerkezetű cink-oxid toxikusabbnak bizonyult a nagyszemcsés formához képest. A kezelés hatása szignifikáns volt mind az expozíciós idő, mind a koncentrációk tekintetében. A kisebb szemcseméretű cink-oxid esetén 24 óra után szignifikáns eltérés ($p > 0,05$) a kontrollhoz képest elsőként a 8,03 mg Zn/l nano-ZnO-dal kezelt állatokat tartalmazó küvettákban jelentkezett: a mortalitás elérte az 58,33%-ot. Egy hét után a 8,03 mg Zn/l-es koncentrációtól kezdődően már 100%-os mortalitás volt tapasztalható. Szignifikáns eltérés ($p > 0,05$) a kontrollhoz viszonyítva már a legkisebb; 0,08 mg Zn/l-es koncentráció esetén is fennállt.

A kereskedelmi forgalomban kapható nanoanyagokkal tapasztalt szemcseméret-problémák áthidalása érdekében elkezdtük néhány laboratóriumban előállított nano cink-oxid ökotoxikológiai hatásainak vizsgálatát. Vizsgáltuk 20 nm átmérőjű, illetve 100-200 nm átmérővel rendelkező cink-oxid hatását szabadon élő fonálféreg fajokra. Az anyagokat dr. Kukovecz Ákos (SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék) bocsátotta rendelkezésünkre.

A két anyaggal mortalitási tesztekét végeztünk a *Xiphinema vuittenezi* növényi táplálkozású fonálféreg fajon. A kontrollhoz képest 24 óra elteltével szignifikánsan különbözött a 20 nm ZnO hatása már a legkisebb koncentrációban is (1,5625 mg Zn/l), a 100-200 nm ZnO hatása pedig 12,5 mg/L esetén különbözött szignifikánsan a kontrollhoz viszonyítva.

Mortalitási tesztekét végeztünk a szabadon élő, baktériumevő táplálkozású *Panagrellus redivivus* L. fonálféreg faj kifejlett nőtény egyedein is. A 24 órás expozíciós idő elteltével a 20 nm cink-oxid részecskék esetében már 6,25 mg Zn/l koncentrációnál a mortalitásra gyakorolt hatás szignifikánsan ($p > 0,05$) nagyobb volt a kontrollhoz képest. Ezzel szemben a 100-200 nm átmérőjű részecskék által a mortalitásra gyakorolt hatás csak 12,5 mg Zn/l koncentráció esetében volt szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva. A kisebb szemcseméret szignifikánsan magasabb mortalitást eredményezett.

Összefoglaló következtetésként levonható tehát, hogy nano szerkezetű xenobiotikum szemcsemérete befolyásolta a toxicitást, oly módon, hogy a kisebb szemcseméretű anyag toxikusabbnak bizonyult.

A kutatás utolsó évében vizsgáltuk egy kereskedelmi forgalomban kapható, nano szerkezetű réz-szulfátot tartalmazó növényvédő szernek (Bordói lé Nano SC) a *Xiphinema index* növényi táplálkozású fonálféreg faj kifejlett nőtény egyedének mortalitására gyakorolt hatását is. A vizsgálat során a NANO SC Bordói lé alábbi koncentrációit alkalmaztuk: 0,0000025, 0,000005, 0,000025 ml, 0,00005 ml, 0,00025 ml, 0,0005 ml, 0,005 ml, 0,05 ml, 0,5 ml, 1 ml/ 100 ml. Az első teszt során gyakorlatban is alkalmazott hígítási aránnyal dolgoztunk, mert nem állt rendelkezésünkre olyan adat, amelyből kiderülne, hogy kijuttatott szernek mekkora hányada éri el a talajt és kerülhet ténylegesen kapcsolatba a fonálféreggel. A második teszt koncentrációit az első teszt során kapott eredmények alapján állítottuk össze. Az expozíciós idő az első kísérletben 24 és 48 óra volt, a második kísérlet esetén 24 óra és 5 nap volt. Ezekben az időpontokban preparáló mikroszkóp alatt állapítottuk meg az egyes koncentrációk által előidézett a mortalitás mértékét és hasonlítottuk össze a kontrollal. A felhasznált kezelőoldatok réztartalmának mérését követően, ezzel azonos réz koncentrációkkal végeztünk tesztekét réz-szulfát felhasználásával.

Az első kísérletben 24 órás expozíciós idő elteltével a szer szignifikánsan növelte a mortalitást a kontrollhoz képest már 0,00005 ml NANO SC Bordói lé/100 ml koncentrációban. A 0,00025 ml NANO SC Bordói lé/100 ml víz koncentráció felett 100% mortalitás tapasztaltunk. A faj tehát igen érzékenynek bizonyult a kezelésre, mivel 24 órás kitettség után a mortalitás 100% volt a javasolt kiskerti felhasználásnál több nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációk esetén is. Ez azért lehet érdekes, mert a túfonálféreg nem célszervezetei az általunk tesztelt, általánosan elterjedt (többek között például organikus művelésű szőlőkultúrákban is megengedett) fungicid kezelésekre használt növényvédő szernek.

Végezetül, a Sigma-Aldrich által forgalmazott nano és nagyszemcsés cink-oxid hatásait vizsgáltuk *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg fajon. A nano szerkezetű, nagyszemcsés szerkezetű, valamint a ZnSO₄ tartalmú oldatokból azonos koncentrációkat állítottunk be: 5, 25, 50 mg Zn/l. Az eredmények alapján a nano ZnO és a ZnSO₄ hasonló hatással voltak az állatok túlélésre, míg a nagyszemcsés ZnO kevésbé negatívan hatott e tesztvégpontra.

Nematoda ökotoxikológiai vizsgálataink főbb eredményei két csoportba sorolhatók. Ezek közül az első, önmagában is értelmezhető kérdéskör annak kimutatása, illetve megerősítése volt, hogy a talajlakó fonálféregnek egyes táplálkozási- illetve életformacsoportjainak stresszhatások iránti érzékenysége nagy mértékben eltérhet egymástól. Mindezek fényében érdemes és szükséges az általánosságban elterjedt, r-stratégista baktériumevő tesztszervezetek (elsősorban a *Caenorhabditis elegans*, ritkábban *Panagrellus redivivus*) körét kiterjeszteni más táplálkozási stratégiájú (pl. fitofág, fungivor, illetve ragadozó) és eltérő életmenetű (pl. K-stratégista) fajokra is.

Az eredmények másik értelmezési aspektusát, a nehézfémek hatásainak mechanizmusaira utaló jeleket a mikroanalitikai vizsgálatok konklúzióival együtt mutatjuk majd be.

B.) Kémiai (mikroanalitikai) vizsgálatok:

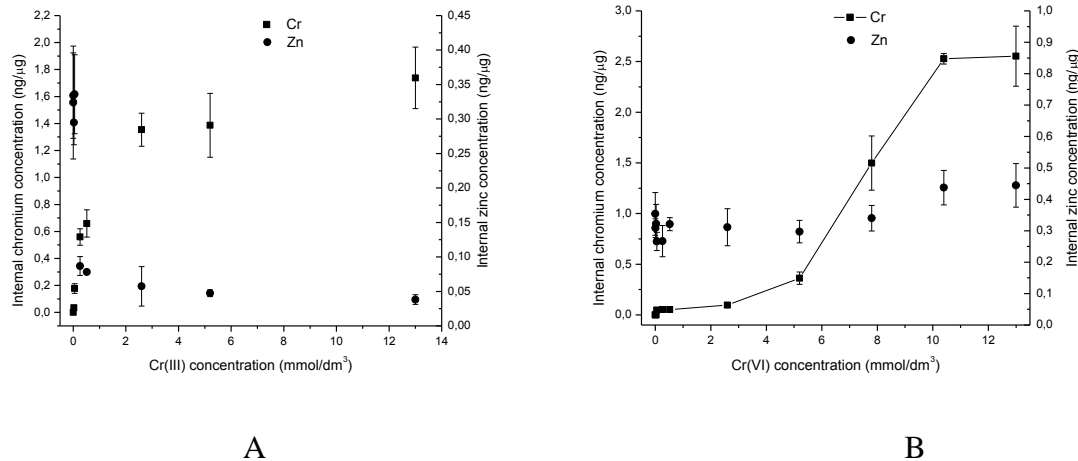
B.1.) TXRF spektrometriai vizsgálatok.

A kutatás első évében módszereket fejlesztettünk az állatok nyomelem-tartalmának meghatározására. A TXRF spektrometriai vizsgálatokat Bécsben, az Atominstitut Atomika 8030C készülékével végeztük. A fonálféregből 9 elemet sikerült a módszerrel kimutatni: P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Ni, Mn. A TXRF spektrometriai módszer egyik kulcsmomentuma volt – tekintettel az egyedi mintákra – a vizsgált állatok tömegének megmérése. Ezért preparáló mikroszkóp segítségével megmértük az állatok hosszát és szélességét (legnagyobb átmérőjét). Ezen adatokból az állatok térfogata, ezen keresztül pedig a tömege megbecsülhető, Andrassy (1956) képlete alapján.

A kutatás második évében vizsgáltuk rezes kezelés hatását az állatok nyomelem tartalmára. Azt találtuk, hogy növelve a kezelés során alkalmazott réz-szulfát oldat koncentrációját, az állat réz-tartalma egy kezdeti nagy meredekségű növekedést követően egy telítési értékhez közelít, míg a cink-tartalom hasonló, de ellentétes irányú változást mutat (Sávoly *et al.* 2012). Vizsgáltuk továbbá az expozíciós idő hatását az 1 óra – 5 nap kezelési idő tartományban, három különböző koncentráció esetén (12,5; 250; 1000 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ réz-szulfát oldat). A két töményebb oldat esetén azt tapasztaltuk, hogy a legjelentősebb növekedés 24 óra elteltével történt, a hígabb oldat esetében azonban öt nap után egy ismét jelentős emelkedés volt tapasztalható, a 24 illetve a 48 óra után mért értékhez képest is.

A kutatás második évében a korábbiakban kidolgozott TXRF módszert alkalmaztuk talajlakó fonálféregnek króm felvételének vizsgálatára. A Cr(III) és Cr(VI) felvételének koncentrációfüggését vizsgálva megállapítottuk, hogy az előbbi speciesből lényegesen többet vesz fel az állat hígabb koncentrációjú oldatok esetén, míg nagyon tömény oldatoknál ($c > 8000 \text{ mg/L}$) a beépült króm mennyisége összemérhető egymással a két különböző kezelés esetén. Tehát a Cr(III)-és a Cr(VI)-kezelés következtében a belső koncentrációértékek eltérő lefutású görbét mutattak (3. ábra). A Cr(VI)-ra vonatkozó görbének az inflexiós pontja nagyjából a Cr(III)-görbe telítődési szintjénél volt. Ebből arra lehet következtetni, hogy a tesztállatok Cr(III)-felvétele alacsonyabb koncentrációtartományban nagyobb, míg a kromátfelvétel a magasabb Cr(VI)-koncentrációtartományban drasztikusan megnövekszik.

Méréseink rávilágítottak arra a tényre is, hogy a trivalens krómmal – Cr(III) – kezelt állatokban a cinktartalom csökkent a krómtartalom növekedésével. Ez az eredmény hasonló a növekvő koncentrációjú rézkezelés során tapasztaltakhoz. Ugyanakkor a jóval kevésbé toxikus Cr(VI) esetében nem találtunk ilyen összefüggést. Ezekben a kezelésekből a cink tartalom nem csökkent a krómkoncentráció növelésével. A fenti eredmények alapján feltételezhető, hogy a króm toxicitása összefüggésben lehet az állatok cinktartalmával. Ennek okait további vizsgálatok keretében kell tisztázni.



3. ábra: *Xiphinema vuittenezi* nőstények Cr-és Zn-tartalma, eltérő krómformákkal történő kezelés esetén. A: Cr(III) kezelés B: Cr(VI) kezelés (Sávoly & Záray, 2014)

Egy másik kísérletben a cink felvételét vizsgáltuk, szintén TXRF módszer segítségével. Ebben a vizsgálatban nano illetve bulk ZnO szuszpenziót és ZnSO₄ oldatot alkalmaztunk kezelőszerként, három különböző koncentrációban. Az utolsó kezelés esetén az esszenciálisnál nagyobb cink koncentrációt mértünk az állatokban, a mért mennyiség azonban nem függött az oldat koncentrációjától. A szuszpenziókkal történő kezelés esetén találtunk koncentrációfüggést, de nem volt lényeges különbség a nano és a bulk forma esetén.

A kezeléshez használt szuszpenziók fizikai és kémiai tulajdonságait különböző műszeres módszerek segítségével jellemeztük. Az általunk használt nano ZnO a specifikáció szerint 50 nm-nél kisebb részecskéket tartalmaz. Transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgálva a szuszpenziókat, jelentős mértékű aggregációt tapasztaltunk. Dinamikus fényszóródás méréssel megállapítható, hogy milyen méretfrakciók vannak jelen a mintában. Két jelentős frakciót találtunk, 150 és 350 µm átlagos hidrodinamikai átmérővel. Vizsgáltuk az oldott cink mennyiségét a koncentráció és a pH függvényében mindkét formára. Minden vizsgált koncentráció és pH esetén a nano formánál nagyobb oldott cink koncentrációt mértünk. Ennek azonban az is lehet az oka, hogy a szilárd részecskéket ultracentrifugálással távolítottuk el. Lehetséges, hogy a nano forma esetén a legkisebb részecskék benne maradtak a vizsgált oldatban. A pH-t csökkentve mindkét forma esetén jelentős növekedést tapasztaltunk az oldott cink koncentrációjában.

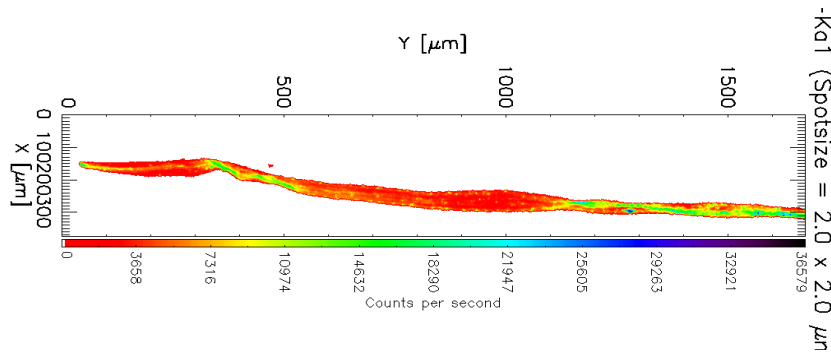
A kutatás utolsó éveiben TXRF spektrometriai vizsgálatokat végeztünk a rézfelvétel vizsgálatára. Az állatok kezelése egy nano réz tartalmú anyag, a Bordói lé Nano SC vizes szuszpenziójával történt. A vegyszer specifikációja szerint az átlagos részecskeméret 500 nm körüli, transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján az ennél jóval nagyobb, kb. 1000 nm, tehát valójában kívül esik az általánosan elfogadott „nano” mérettartomány (legalább 1 dimenziójában < 100 nm) keretein. A vizsgálatokat három koncentrációnál végeztük, az állatban mért rézkoncentrációkat összehasonlítottuk hasonló koncentrációjú vizes oldatokkal történő kezelés esetén korábban mért értékekkel. Megállapítható, hogy a rézfelvétel minden esetben szignifikánsan eltér a két különböző típusú kezelőszer esetén, kisebb koncentrációknál (0,1 mmol/L és 1 mmol/L) a „nano” szuszpenzió, míg nagyobb koncentrációnál (10 mmol/L) az oldat esetén intenzívebb a rézfelvétel.

Vizsgáltuk előzetesen elpusztított állatok elemfelvételét is. Ennek célja az volt, hogy információkat szerezzünk arra nézve, hogy a fonálférgek élő állapota befolyásolja-e az elemek felvételét. Az állatok elpusztítása rövid idejű melegítéssel (ún. „hőmrevítéssel”) történt. Vizsgáltunk olyan állatokat is, melyek a kezelés megkezdés előtt még éltek. A kezeléseket öt óráig tartották és a következő két kezelést végeztük el: 1 mmol/L CuSO_4 -oldat és 100 mmol/L $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ -oldat. Rézkezelés esetén az előzetesen elpusztított állat elemfelvétele szignifikánsan nagyobb volt, mint a kezelés kezdetekor még élő példányoké. A krómmal történt kezelés esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két csoport között.

B.2.) Szinkrotronos vizsgálatok

A kutatás első éve során részt vettünk egy mérésben a berlini Helmholtz-Zentrumban, a BESSY II szinkrotron BAMline sugárnyalábja segítségével végeztük vizsgálatainkat. Megkíséreltük az állatokban a nyomelemek eloszlását meghatározni. Vizsgáltunk egy, a természetes környezetéből kinyert egyedét és egy Cu^{2+} , Cr^{3+} , SeO_3^{2-} tartalmú oldatban tizenöt percig tárolt állatot. A rendelkezésünkre álló nyalábidő alatt nem sikerült az állatokat teljes mértékben végigpásztázni, de megállapítható, hogy a három elem dúsulása során jellegzetes „hotspotok” figyelhetők meg. A XANES technika segítségével információt nyerhetünk arra vonatkozóan is, hogy az adott szennyező elemeknek milyen a kémiai környezete.

A kutatás második évében a rezek kezelés hatásának további vizsgálatára szinkrotronos méréseket végeztünk, a Helmholtz Zentrum Berlin, BAMline szinkrotronnyalábján. Vizsgáltuk a réz kétdimenziós eloszlását, az eloszlás többnyire homogén, kisebb felhalmozódások vannak, de a biomineralizáció kizárható (4. ábra). XANES technika segítségével vizsgáltuk a réz kémiai környezetét. A kapott spektrumokban különbség mutatkozik, az esszenciálisan jelenlevő, és a kezeléssel bevitt réz esetén. A kezelést elvégeztük réz-szulfáttal, és réz-nitráttal is, hogy vizsgáljuk az anion hatását, de ebben az esetben nem mutatkozott lényeges eltérés a spektrumok között.



4. ábra: A kezelt fonálféreg réztartalmának alakulása (Sávoly *et al.* 2013a)

A kutatás harmadik éve során XANES technika segítségével vizsgáltuk K_2CrO_4 -tal és nano illetve bulk ZnO-dal kezelt állatokban a króm illetve cink kémiai környezetét. A kromát jelentős mennyisége Cr(III)-má alakult az állat szervezetében, de emellett kis mennyiségű kromát is jelen volt még. Nano és bulk ZnO esetén teljesen hasonló volt a spektrumok szerkezete. A feji részben valószínűleg ZnO is van még jelen, a farki részen azonban egészen más szerkezetű volt a spektrum, tehát a ZnO valószínűleg átalakul az állat szervezetében történő áthaladás során.

A kutatás utolsó éve során a korábban végzett XANES vizsgálatok részletesebb adatfeldolgozását is elvégeztük. A vizsgált minták spektrumát illesztettük referencia-vegyületek spektrumaival, az illesztések eredménye a következő (Sávoly *et al.* 2014):

10 mmol/L $CuSO_4$ -oldat, 24 óra, vizsgálat a testközép környékén: $Cu_3(PO_4)_2$: 40%; Cu-Aqu: 27%; Cu-Cys: 14%; Cu-Gly: 10%; Cu-His: 9%; $R=0,000194$.

50 mg/L nagyszemcsés ZnO-szuszpenzió, 24 óra, eltérő testtájak vizsgálatai:

a fej környékén: ZnO: 56%; $Zn_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$: 23%; Zn-His: 21%; $R: 0,000458$.

a testközép környékén: ZnO: 36%; $Zn_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$: 6%, Zn-His: 58% $R: 0,000827$.

a fark környékén: ZnO: 15%; $Zn_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$: 53%; Zn-His: 32%; $R: 0,000350$.

50 mg/L nano ZnO-szuszpenzió, 24 óra, eltérő testtájak vizsgálatai:

a fej környékén: nano ZnO: 27%; $Zn_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$: 50%; Zn-His: 19%; $R: 0,000420$.

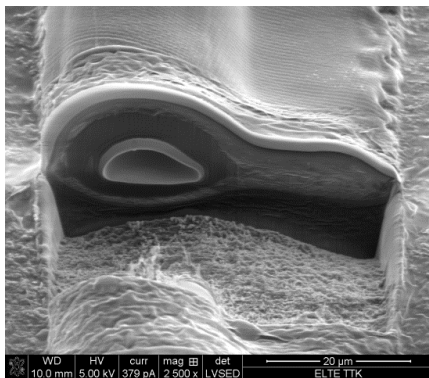
a testközép környékén: nano ZnO: 23%; $Zn_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$: 24%; Zn-His: 53%; $R: 0,000729$.

a fark környékén: nano ZnO: 19%; $Zn_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$: 30%; ZnS: 51%; $R: 0,000828$.

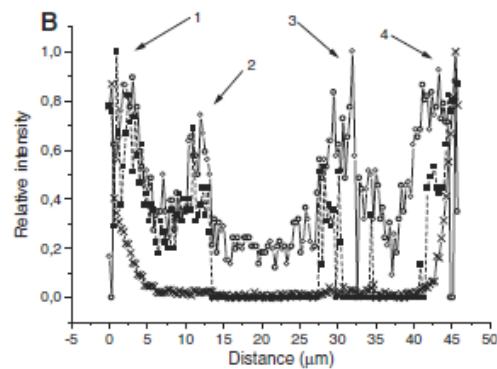
Ezen vizsgálatok eredménye is a testen belüli átalakulásra, valamint a foszfornek a detoxifikációban betöltött fontos szerepére utal.

B.3.) FIB-SEM vizsgálatok

A kutatás második éve során a szennyezőanyagok térbeli eloszlásának vizsgálata érdekében a FIB-SEM technikát alkalmaztuk. Vizsgáltuk a rézzel kezelt mintákban a makroelemek (C, N, O, S, P, K, Ca) és a kezelés során felvett réz térbeli eloszlását. Készítettünk elemtérképeket bizonyos kezelés esetén kisebb területekről. Ezen kívül vizsgáltuk az állatok testfelszínén, illetve annak közelében az egyes elemek hosszirányú eloszlását kvantitatív módon. Tíz egyenlő hosszúságú területszakaszon mértük az egyes elemek jelintenzitását. Az így kapott eloszlásokat relatív skálán megadva az egyes elemek eloszlásának egymáshoz képesti viszonya statisztikailag vizsgálható, az eredmények feldolgozása folyamatban van. Az állatot a test közepénél elmesztettük és a kapott keresztmetszetet simává tettük a FIB technika segítségével (5. A ábra). A keresztmetszetben vizsgáltuk az elemeloszlást vonalmenti röntgenanalízis alkalmazásával. Az eredmények feldolgozása hasonló a hosszirányú vizsgálatoknál említetthez. A réz eloszlásának csúcsértékei alapján megállapítható, hogy az elemfelvétel elsősorban kívülről, a kutikula irányából történik és nem a tápcsatornából. A réz és a kén eloszlása jó megfelelést mutatott egymással (5. B ábra).



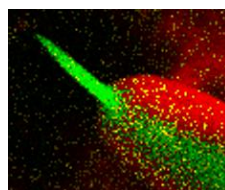
A



B

5. ábra: A – a FIB SEM vizsgálatnak kitett fonálféreg keresztmetszeti képe (jól látható a bélcsatorna és a kültakaró alatti izomzat). B – elemek eloszlása egy fonálféreg keresztmetszete mentén: kén (o) réz (■), platina (bevonóanyag - x) (Sávolgy *et al.* (2012))

A kutatás harmadik évében pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk az állat feji részében az elemeloszlást. A szájszervet körülvevő ajakban találtuk a legnagyobb mennyiségű kén és rézet, a szájszervben nagy mennyiségű kén van jelen (6. ábra), a réztartalom csekély, a fejben mindkét elem koncentrációja kicsi.



6. ábra: A szájszurony magass kén- és réztartalmát jelző elemeloszlási kép

Fókuszált ionnyaláb segítségével liofilizált állatokat vágunk ketté és vizsgáltuk az elemeloszlást a keresztmetszetekben. K_2CrO_4 -tal és nano ZnO-dal történő kezelés esetén is hasonló elemeloszlásokat tapasztaltunk: a króm illetve Zn intenzitása befelé haladva csökkent. Kromáttal történő kezelés esetén a króm eloszlása erős korrelációt mutatott a foszfor és a kén eloszlásával is. ZnO esetén gyengébb korrelációt tapasztaltunk (Sávoly *et al.* 2013b).

A kutatás utolsó éveiben vizsgáltuk különböző kezeléseknek kitett állatok keresztmetszetében a kezelőszerben lévő fém és a foszfor és kén, némely esetben ezeken kívül a kálium és kalcium kétdimenziós eloszlását. A kálium és kalcium eloszlása eléggé inhomogénnek bizonyult az állat testében, ezért egyes keresztmetszetekben nem voltak az elektronsugaras mikroanalízis módszerével kimutatható mennyiségben jelen. Különböző helyeken végeztünk bemetszéseket (fej, testközép, farok környéke). A következő kezeléseket végeztük: 1mmol/L $Cu(NO_3)_2$ -oldat, 50 mmol/L K_2CrO_4 -oldat, 50 mg/L $ZnSO_4$ -oldat, 50 mg/L nagyszemcsés, illetve nano ZnO-szuspenzió, a kezelési idő 24 óra volt minden esetben. Mindhárom fém esetén erősebb korrelációt találtunk a fém és a foszfor eloszlása között, mint a fém és a kéné között. Bizonyos esetekben (króm és cink esetén) azokon a helyeken, ahol a foszfor és az adott fém együtt volt jelen, kalcium jelenlétét is megfigyeltük. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a fő detoxifikációs útvonal réz, króm és cink esetén foszfáttartalmú szemcsék képződése, melyek kalciumot is tartalmazhatnak. A nagyszemcsés és nano ZnO-dal történő kezelés esetén az állat fejében olyan területeket is megfigyeltünk, ahol a cinken kívül semelyik másik vizsgált elem nem volt kimutatható, itt valószínűleg a cink ZnO-ként van jelen.

Kutatásaink mikroanalitikai eredményeiből az alábbi következtetések vonhatók le:

- egyes nehézfémek felvétele és toxicitása függ a kezelőanyag minőségétől (nano ill. „bulk”), és koncentrációjától, valamint az expozíciós idő hosszától. Réz esetében az állatok élő vagy elpusztult állapota is befolyásolja a felvételi viszonyokat.
- a felvétel döntően kutikuláris expozíció következtében történik, nem a tápcsatornán át.
- az egyes króm species-ek: Cr(III) és Cr(VI) toxicitása közötti különbségek jól magyarázhatók az adott anyagok felvételi mintázataival.
- egyes esszenciális elemek (pl. kén, foszfor) koncentrációi szoros összefüggést mutatnak a szennyező anyagok (réz, króm) koncentrációjával, illetve térbeli elhelyezkedésével. Ugyanakkor pl. a cink és a réz koncentrációi és térbeli eloszlása között ellentétes tendenciák voltak kimutathatók.
- XANES spektrumok illesztése révén kimutattuk nehézfémek átalakulásának folyamatát a fonálférgék testén belül. A kromát tartalom nagy része trivalens krómmá alakult. A réz-szulfát, valamint a nano és a nagyszemcsés ZnO spektruma is egyaránt megváltozott az állatok testében. Ezen nehézfémek egy része foszfáttartalmú vegyületekké alakult, ami rávilágít a foszfor fontos szerepére a cink és réz detoxifikációjában.
- Szintén a foszfor detoxifikációs szerepét támasztották alá a keresztmetszeti elemeloszlás FIB-SEM vizsgálata során kapott korrelációk a foszfor, valamint réz, a cink, illetve a króm koncentrációi között, amelyek magasabbak voltak, mint a fémek és a kén értékei közöttiek.

Felhasznált irodalom:

Andrássy, I. (1956): Die Rauminhalts-und Gewichtsbestimmung der Fadenwürmer (Nematoden). *Acta Zool. Budapest*, 2: 1-15.

Baross N. (2010): Ökotoxikológiai vizsgálatokhoz kapcsolódó módszertani kísérletek fonálférgekkel. Diplomadolgozat, SZIE MKK Környezetmérnök MSc szak, Gödöllő, pp. 40.

Bongers, T. (1990): The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83: 14-19.

Ferris, H., Bongers, T., De Goede, R. G. M. (2001): A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Appl. Soil Ecol.*, 18:13-29.

Sávoly, Z., Záray, Gy. (2014): Study of bioaccumulation and biotransformation by microanalytical X-ray techniques: investigation of distribution and speciation of Cu and Cr in the body of the plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*. *Spectrochimica Acta Part B* 101: 342–350. [doi:10.1016/j.sab.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.09.010)

Sávoly, Z., Nagy, P., Havancsák, K., Záray, Gy. (2012) Microanalytical investigation of nematodes. *Microchemical Journal*, 105:83-87.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.021>

Sávoly, Z., Pepponi, G., Nagy, P., Strelí, Ch., Buzanich, G., Záray, Gy. (2013a): Investigation of copper distribution and speciation in soil-inhabiting nematodes by means of synchrotron radiation. *X-ray Spectrometry*, 42: 321-329.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/xrs.2481>

Sávoly, Z., Nagy, P., Varga, G. Havancsák, K., Hrács, K., Záray, Gy. (2013b): A novel method for investigation of uptake and distribution of polluting microelements and nanoparticles in soil-inhabiting nematodes. *Microchemical Journal*, 110:558-567.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.07.007>

Sávoly, Z., Buzanich, G., Pepponi, G., Strelí, Ch., Hrács, K., Nagy, P., Záray, Gy. (2014): The fate of nano-ZnO and its bulk counterpart in the body of microscopic nematodes: An X-ray spectrometric study. *Microchemical Journal* 118:80-87.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.08.011>

s'Jacob, J., Van Bezooijen, J. (1984): A manual for practical work in nematology. Department of Nematology, Wageningen Agricultural University. 77 pp.

Takács T. (2013): Nehézfémek anyagforgalmának ökotoxikológiai és mikroanalitikai vizsgálata fonálféreg modellszervezeten. Diplomadolgozat, SZIE MKK Környezetmérnök MSc szak, Gödöllő, pp. 60.