



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS**

***AZ ATRAZINE ÉS TERBUTHYLAZINE HATÓANYAGOK  
BIODETOXIFIKÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA KOMPLEX BIOLÓGIAI  
HATÁSMÉRŐ MÓDSZEREKKEL***

**HÁHN JUDIT**

Gödöllő

2017

A doktori iskola

**megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Környezettudomány

**vezetője:** Csákiné Dr. Michéli Erika, DSc  
egyetemi tanár  
Szent István Egyetem,  
Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar,  
Környezettudományi Intézet

**Témavezető:** Dr. Szoboszlay Sándor, PhD  
egyetemi docens, tanszékvezető  
Szent István Egyetem,  
Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar,  
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....  
az iskolavezető jóváhagyása

.....  
a témavezető jóváhagyása

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>BEVEZETÉS .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>9</b>
3.1	A PESZTICIDEKRŐL ÁLTALÁBAN .....	9
3.2	ATRAZINE ÉS TERBUTHYLAZINE FIZIKO-KÉMIAI PARAMÉTEREI, HATÁSMECHANIZMUSA, FELHASZNÁLÁSA.....	9
3.3	VONATKOZÓ HATÁRÉRTÉKEK, ATRAZINE ÉS TERBUTHYLAZINE JELENLÉTE KÖRNYEZETI ELEMÉKBEN.....	12
3.4	NEM CÉLSZERVEZETEKRE GYAKOROLT BIOLÓGIAI HATÁSOK .....	15
3.4.1	<i>Atrazine</i> .....	15
3.4.2	<i>Terbuthylazine</i> .....	19
3.4.3	<i>Nemzetközi szervezetek állásfoglalása</i> .....	20
3.5	MIKROBIÁLIS DEGRADÁCIÓ.....	22
<b>4</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>27</b>
4.1	BIODEGRADÁCIÓS KÍSÉRLET .....	27
4.1.1	<i>Alkalmazott baktériumtörzsek és konzorciumok</i> .....	27
4.1.2	<i>Bontási kísérletek összeállítása</i> .....	31
4.2	CITOTOXICITÁS MÉRÉS ALIIVIBRIO FISCHERI BIOLUMINESZCENCIA-GÁTLÁSI TESZTTTEL .....	32
4.2.1	<i>Akut Microtox® teszt</i> .....	33
4.2.2	<i>Krónikus A. fischeri teszt</i> .....	34
4.3	KOMBINÁLT MÓDSZER KIFEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA KÖZVETETT ENDOKRIN DISZRUPTOR HATÁS MÉRÉSÉRE.....	35
4.3.1	<i>H295R sejtvonala és tenyésztési körülmények</i> .....	36
4.3.2	<i>BLYES, BLYAS és BLYR tesztek</i> .....	37
4.4	ADATOK KIÉRTÉKELÉSE .....	39
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>	<b>41</b>
5.1	ATRAZINE ÉS TERBUTHYLAZINE BAKTERIÁLIS BIODEGRADÁCIÓJA .....	41
5.1.1	<i>Egyedi törzsek biodegradációs képessége</i> .....	41
5.1.2	<i>Konzorciumok biodegradációs képessége</i> .....	43
5.2	ALIIVIBRIO FISCHERI CITOTOXICITÁSI TESZTEK .....	45
5.2.1	<i>Akut és krónikus teszt érzékenységének összehasonlítása</i> .....	45
5.2.2	<i>Atrazine és terbuthylazine bontási maradékanyagainak citotoxicitása</i> .....	47
5.3	AZ ATRAZINE INDIREKT ENDOKRIN DISZRUPTOR HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA .....	50
5.3.1	<i>Keresztreakció a BLYES és BLYAS tesztek között</i> .....	51
5.3.2	<i>A tiszta testanyagok ösztrogén és androgén hatása</i> .....	51
5.3.3	<i>H259R sejtek szteroidogenezis tesztből származó felülűszóinak hormonhatása</i> .....	53

5.4	<i>ATRAZINE</i> BIODEGRADÁCIÓBÓL SZÁRMAZÓ MARADÉKANYAGOK INDIREKT ENDOKRIN DISZRUPTOR HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA.....	57
5.5	ÖSSZEGZÉS: <i>ATRAZINE</i> ÉS <i>TERBUTHYLAZINE</i> BIODETOXIFIKÁCIÓJA AZ ALKALMAZOTT BIOLÓGIAI HATÁSMÉRŐ TESZTEK EREDMÉNYEI ALAPJÁN.....	59
<b>6</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>ENGLISH SUMMARY.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>MELLÉKLETEK.....</b>	<b>71</b>
M1.	IRODALOMJEGYZÉK.....	71
M2.	A KUTATÓMUNKA SORÁN MEGFOGALMAZOTT CÉLOK ÉS AZ AZOK MEGVALÓSÍTÁSÁHOZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK FOLYAMATÁBRÁJA. ....	89
M3.	<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (BLYES, BLYAS, BLYR) TÁPOLDATÁNAK ÖSSZETÉTELE .....	90
M4.	<i>ATRAZINE</i> AKUT MICROTOX TESZT JEGYZŐKÖNYV.....	91
M5.	<i>TERBUTHYLAZINE</i> AKUT MICROTOX JEGYZŐKÖNYV .....	92
M6.	<i>A. FISCHERI</i> BIOLUMINESZCENCIA GÁTLÁS <i>ATRAZINE</i> HATÁSÁRA KRÓNIKUS TESZTBEN.....	93
M7.	<i>A. FISCHERI</i> BIOLUMINESZCENCIA GÁTLÁS <i>TERBUTHYLAZINE</i> HATÁSÁRA KRÓNIKUS TESZTBEN. ....	94
M8.	FORSKOLIN ÉS <i>PROCHLORAZ</i> HATÁSÁRA EMELKEDETT ÉS CSÖKKENT ÖSZTROGÉN ÉS ANDROGÉNHATÁS KIMUTATÁSA ÉLESZTŐ TESZTTTEL BIOLUMINESZCENCIA INTENZIFIKÁCIÓBAN KIFEJEZVE.....	95
M9.	<i>ATRAZINE</i> HATÁSÁRA EMELKEDETT ÖSZTROGÉN ÉS ANDROGÉNHATÁS KIMUTATÁSA ÉLESZTŐ TESZTTTEL BIOLUMINESZCENCIA INTENZIFIKÁCIÓBAN KIFEJEZVE. ....	96
<b>10</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>97</b>

# 1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	Adenozin-trifoszfát
AVF	<i>Aliivibrio fischeri</i>
BLYAS	Bioluminescent yeast androgen screen
BLYES	Bioluminescent yeast estrogen screen
BLYR	Bioluminescent yeast reporter
BSA	Marha szérum albumin (bovine serum albumin)
cAMP	Ciklikus AMP (adenozin-monofoszfát)
CPS	fotonbecsapódás/másodperc (counts per second)
CYP19	Aromatáz enzimet kódoló gén
DEA	Deetil- <i>atrazine</i>
DHT	5- $\alpha$ -dihidrotesztoszteron
DIA	Deizopropil- <i>atrazine</i>
DMSO	dimetil-szulfoxid
DT <sub>50</sub>	féléletidő (mely alatt egy vegyület kiindulási mennyiségének 50%-a elbomlik)
E2	17- $\beta$ -etinilösztadiol
EC <sub>50</sub>	50%-os hatást kiváltó koncentráció (effective concentration)
ED	Endokrin diszruptor
EDC	Endokrin diszruptor vegyület (endocrine disrupting chemical)
EFSA	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (European Food Safety Authority)
ETC	Elektrontranszport lánc (electron transport chain)
FCS	Fötális borjú szérum (fetal calf serum)
H295R	Humán adrenokortikális karcinóma sejtvonala
IARC	Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (International Agency for Research on Cancer)
LC <sub>50</sub>	Tesztorganizmusok 50%-ának pusztulását okozó letális koncentráció
LD <sub>50</sub>	Tesztorganizmusok 50%-ának pusztulását okozó letális dózis
LOEC	Legalacsonyabb, megfigyelhető hatást kiváltó koncentráció (Lowest-observed-effect concentration)
NAD	Nikotinamind-adenin-dinukleotid
OCSP	Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (US EPA)
US EPA	Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (Environmental Protection Agency)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
YMM	Élesztő minimál tápoldat (yeast minimal medium)



## 2 BEVEZETÉS

Az elmúlt fél évszázadban az emberi populáció duplájára növekedett, melyhez hasonló ütemben emelkedett a globális mezőgazdasági termelés mértéke is. Azonban a megművelhető területek nagysága mindössze csak 10%-kal nőtt, a világnépesség élelmiszerigényeinek kielégítésére tett erőfeszítések következménye – többek között – a felhasznált peszticidek mennyiségének drasztikus emelkedése. Haszonnövényeink és állataink védelmére használt vegyszeres kezelések során azonban a hatóanyagok egy része nem ér célba, a környezeti elemekbe jutva később megjelenő, globális mértékű problémák okozói lehetnek. A növényvédő szerek környezeti kockázatainak széleskörű ismertetésben úttörő volt 1962-ben Rachel Carson akkoriban még el nem ismert *Néma tavasz* című műve, melyben a DDT és metabolitjai ragadozó madarak populációinak csökkenésére gyakorolt hatására hívta fel a figyelmet. Azóta – amikor a modern környezetvédelem megszületését is datáljuk – hihetetlen tudásbázis alakult ki a peszticidek nem célszervezetekre és környezetre gyakorolt hatásairól, számos nemzetközi egyezmény született hatóanyagok betiltásáról. Utóbbival párhuzamosan azonban újabbak és újabbak jelennek meg, kerülnek a mezőgazdasági gyakorlat palettájára sokszor anélkül, hogy a nem célszervezetekre és környezetre gyakorolt komplex káros hatásait ismernénk és értenénk. Az emberiség bioszférát átalakító tevékenysége az ipari-, majd utána a zöld forradalommal olyan mértékűvé vált, hogy már saját jóllétünket sőt, létünket veszélyeztetjük.

Doktori kutatási éveim során a PSII-es fotoszintetikus rendszert gátló, szimmetrikus triazinok családjába tartozó két gyomirtó szer hatóanyaggal, az *atrazine*-nal és *terbuthylazine*-nal foglalkoztam. Az *atrazine* '50-es évek végi bevezetése után az egyik legnagyobb mennyiségben gyártott és felhasznált herbicid volt világszerte, azonban erősen vízszennyező tulajdonságára hivatkozva a 2000-es évek elején az Európai Unió betiltotta használatát. Időközben kiterjedt kutatás eredményeképpen stabilan körvonalazódott, hogy a vegyület számos, nem célszervezetre gyakorol citotoxikus, immunotoxikus, karcinogén, teratogén és a hormonháztartás természetes működését megzavaró hatást már olyan kis koncentrációkban is kifejti, melyek gyakran és elterjedten detektálhatók a környezeti elemekben, veszélyeztetve egyes ökoszisztémák jelenleg normálisnak tartott működését. A kutatási eredmények ellenére a nemzetközi szervezetek lényegesen kisebbnek ítélik az *atrazine* által jelentett kockázatot, az EU-n kívül számos helyen jelenleg is alkalmazzák, az Egyesült Államokban a *glyphosate* után második legnagyobb, évi kb. 33 ezer tonnás mennyiségben. A vegyület továbbá perzisztens (az abiotikus tényezőktől függően néhány száz naptól több évig is terjed a vegyület félféletideje), UV-fénytől mentes, redukív körülmények közé kerülve pedig becsapdázódik, ahol akár évtizedeken keresztül is megmarad, ill. tovább szennyez más környezeti elemeket. Erre ékes bizonyíték, hogy azokban az

országokban, ahol jelenleg használatos, de az Unió egyes országaiban betiltása után évekkal is a legtöbbször kimutatott felszíni- és felszín alatti peszticid a két leggyakoribb bomlástermékével együtt, és – mivel bolygónk rendszert alkot, ahol minden környezeti elem kapcsolatban van a másikkal – kimutatható sarki jégből, tengerek vizéből, esővízből is, az alkalmazás helyétől akár több ezer kilométer távolságra. A *terbuthylazine*, ami szerkezetileg egy metil-csoport eltéréssel megegyezik az *atrazine*-nal, jelenleg annak helyettesítőjeként használatos az EU-ban. Noha ezt az anyagot nem vizsgálták – még – olyan sok kutatásban, az kezd körvonalazódni, hogy perzisztenciája, valamint egyéb káros biológiai hatásai az *atrazine*-hoz nagyon hasonlóak, és környezeti elemekből elterjedt alkalmazása miatt szintén a leggyakrabban kimutatott hatóanyagok között foglal helyet.

A környezetvédelemben – mint máshol is – a legkézenfekvőbb és kifizetődőbb a prevenció, azonban ez a legtöbb esetben nem valósul meg, így a már bekövetkezett károk felszámolására, mérséklésére kiemelt figyelmet kell fordítanunk. Más xenobiotikumokhoz hasonlóan a peszticidek környezeti elemekből történő eliminálására is a jelenleg gyakorlatban alkalmazott kármentesítési technikák között a bioremediáció a legjobb megoldás. Különböző élő szervezetekkel történő szennyező-anyag lebontás más technikákhoz képest költséghatékony, valamint a környezet lehető legkisebb bolygatásával járó eljárás. Munkám során az *atrazine* és *terbuthylazine* biológiai, bakteriális úton történő bontását kutattam. Jelenleg a biodegradációs kármentesítési technikák nagy hiányossága, hogy a lebontás során keletkező metabolitok és maradékanyagok biológiai hatás-vizsgálatára nem kerül sor, mivel a gyakorlatban jelenleg csupán az anyavegyület kémiai- vagy immunanalitikai úton történő csökkenésének detektálása a cél. Azonban a baktériumok, noha képesek lehetnek szén és/vagy elektronforrásként, adott esetben elektron akzeptorként hasznosítani a szerves szennyezőanyagokat, korántsem biztos, hogy ártalmatlan anyagokká képesek őket átalakítani, bár a kiindulási vegyület az analitika „szeme” elől eltűnik. Az *atrazine* és *terbuthylazine* esetében sincs ez másként. A két vegyület biológiai lebontásának útvonalai, a keletkező metabolitok nagyjából ismertek, azonban ezek analitikai monitorozása (amennyiben egyáltalán van rá kifejlesztett detektálási módszer) egy bioaugmentációs beavatkozás során ésszerűtlenül nagy terhet jelent, továbbá kérdés marad, hogy önmagukban és más vegyületekkel interakcióba lépve, egymás hatását gyakran felerősítve az élőlényekre milyen biológiai hatásokat képesek gyakorolni. Épp ezért, ma már gondot kell fordítani arra, hogy ne csak a szó szoros értelmében vett biodegradációval, hanem egy anyag biodetoxifikációjával foglalkozzunk, mely során a szennyezőt nemcsak lebontjuk, de a toxicitást is megszüntetjük.



Doktori kutatási munkám során céljaim a következők voltak:

I. Az *atrazine* és *terbuthylazine* biológiai úton, baktériumok tiszta tenyészei által történő lebonthatóságának vizsgálata

II. A biodegradáció hatékonyságának növelése bakteriális konzorciumok alkalmazásával

III. A tiszta hatóanyagok és bontási maradékok hosszú távú expozíció során kiváltott sejttoxikus hatásának megállapítása krónikus citotoxikus hatás mérésére alkalmas ökotoxikológiai módszerrel,;

IV. Az *atrazine* indirekt, nemi hormonok szintézisét megzavaró komplex endokrin diszruptor (ED) hatásainak kimutatására alkalmas kombinált módszer fejlesztése

V. Az *atrazine* és *terbuthylazine* hatóanyagok biotetoxifikációjának nyomon követése a kombinált ED hatás, valamint a krónikus citotoxicitás mérésére alkalmas biológiai hatásmérő tesztek segítségével

VI. Olyan baktériumtörzsek és konzorciumok szelekciója, melyek káros biológiai hatással nem rendelkező maradékanyagokká képesek a herbicideket degradálni.



## 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 3.1 A peszticidekről általában

Peszticideknek nevezzük azokat a vegyületeket vagy azok keverékeit, melyek alkalmazásával a haszonnövények és termények védelmének érdekében kivédhetők, kiirthatók vagy kontrollálhatók a kórokozók és kártevők, beleértve emberi és állati betegségek vektorait, valamint nem kívánatos növény- és állatfajokat. A peszticidek továbbá alkalmazhatóak az állatok külső- és belső élősködői, rovarok és pókszabásúak elleni védekezésben is (OECD 1997).

Az egész világon felhasznált peszticidek éves mennyisége megközelítőleg 3 millió tonna/év, melynek 45%-a Európában, 25%-a az Egyesült Államokban, további 25%-a a világ egyéb részein kerül felhasználásra. Indiában ez az arány mindösszesen 3,75% (De et al. 2014). A világszinten felhasznált peszticidek 49%-a gyomirtó (herbicid), 18%-a rovarirtó (inszekticid), 14%-a gombaölő (fungicid), 19%-a egyéb gázosító növényvédő szer (US EPA 2017).

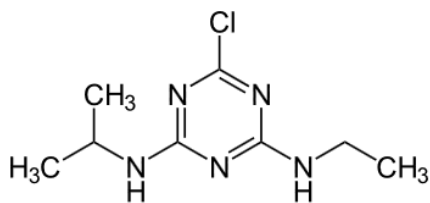
A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal szerforgalmi jelentése alapján, Magyarországon 2014-ben közel 30 ezer tonna növényvédő szer került forgalomba, melynek harmadát (több, mint 11 ezer tonna) a herbicidek tették ki. Mindez összesen 9 ezer tonna hatóanyagot jelent, melyek közül a vezető *glyphosate* után (1300 t) nyolcadik helyen végzett a *terbuthylazine* (280 t) hatóanyag (NÉBIH 2015). Az atrazine, melynek felhasználása 2004 óta tiltott az EU-ban, azonban a mai napig az Egyesült Államokban, valamint még közel 80 másik országban a legnagyobb mennyiségben felhasznált herbicidek között foglal helyet (http1).

### 3.2 *Atrazine* és *terbuthylazine* fiziko-kémiai paramétereit, hatásmechanizmusa, felhasználása

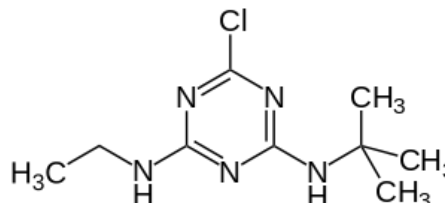
Mindkét vizsgált herbicid hatóanyag, az *atrazine*<sup>1</sup> (1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine<sup>2</sup>, C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>) és a *terbuthylazine*<sup>1</sup> (N-tert-butyl-6-chloro-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine<sup>2</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>) is a szimmetrikus klór-triazinok csoportjába tartozó vegyületek. Fotoszintézist gátló pre- és posztemergensenként alkalmazott gyomirtó hatóanyagok, melyeket széles levelű gyomok és gyomfűvek irtására, elsősorban kukorica, cukornád és cirok gyomirtásában használnak széles körben a világon, de használatuk számos más növénykultúrában is elterjedt (IARC 1999, WHO 1998).

<sup>1</sup> ISO közhasználatú név, melyet a továbbiakban alkalmazok a dolgozatban

<sup>2</sup> IUPAC nevezéktan szerinti név



1. ábra – Az *atrazine* szerkezeti képlete  
(http2)



2. ábra – A *terbuthylazine* szerkezeti képlete  
(http3)

Szerkezetüket tekintve igen hasonlóak, az 1,3,5-triazingyűrű 2. szénatomjához egy klórligandum, a 4. és 6. szénatomjához aminocsoportok, azokhoz pedig alkilszubsztituensek kapcsolódnak. Az *atrazine* és *terbuthylazine* között mindössze egyetlen metil-csoport a különbség (1. és 2. ábrák).

Fizikai megjelenésüket tekintve az *atrazine* fehér, szagtalan kristályos por, míg a *terbuthylazine* piszkosfehér, rothadó avas szagú, viaszos, porszerű anyag. Oldhatóságuk vízben kismértékű (33, ill. 8,5 mg/L 20 °C-on), szerves oldószerekben viszonylag jól oldódnak (dimetil-szulfoxidban 183, ill. 25 g/L, acetonban 31, ill. 41 g/L 25°C-on) (US EPA 1995, WHO-IARC 1999, http2, http3)

Hatásmechanizmusukat a PSII fotoszintetikus rendszeren keresztül fejtik ki, amelynek központi részét képező heterodimer D1 (Qb, vagy *psbA*-ként is ismert) fehérjéhez tudnak kötődni, elfoglalva ezzel a plasztokinon kötőhelyét, szétkapcsolva az elektrontranszport rendszert, mely következményeként végső soron nem keletkezik NADPH és ATP, mely a sejt elhalásához vezet (Trebst 2008).

Az *atrazine* gyártását 1958-ban a J. R. Geigy Ltd. kezdte meg Schweizerhalle-ban (Svájc) (az első szimmetrikus klór-triazin a *simazine* volt, melynek gyártása 1956-ban kezdődött meg). Az *atrazine* és *simazine* után a Geigy számos másik klór- és egyéb triazin herbicid kutatás-fejlesztését kezdte el. Az *atrazine* utáni egyre növekvő igény következményeként a Geigy 1969-ben új gyárban kezdte meg a gyártást St. Gabriel-ben (Louisiana). Az új létesítmény tervezésének részeként intenzív kutatómunka és fejlesztés vette kezdetét Alabamában és Baselben, melyek a gyártási folyamatok javítására, tökéletesítésére irányultak. Az új és hatékony létesítmény Louisiana-ban számos elismerésben és díjban részesült, jelenleg pedig a világon felhasznált összes, Syngenta által forgalmazott *atrazine*, *simazine* és *terbuthylazine* gyártója. 1970 és 1976 között, mikor az eredeti triazinok szabadalmi oltalma lejárt, számos másik cég (Fisons az Egyesült Királyságban, Makhteshim-Agan Izraelben, Oxon Olaszországban és Sanachem Dél-Afrikában) kezdte meg a gyártásukat, majd világszerte az értékesítést. 1981-re a Shell saját *cyanazine* és *atrazine* gyártó üzemmel rendelkezett, mely termékek és forgalmazásuk 1987-ben a Du Pont-ra ruházódott. Jelenleg az Egyesült Államokban több, mint 140 különböző

*atrazine*-terméket kínál 41 cég (Heri et al. 2008), ahol évente megközelítőleg 36 ezer tonna *atrazine*-t használnak fel (Thelin&Stone 2010). Az Egyesült Államokon kívül számos országban elterjedt a használata.

A globális *atrazine*-felhasználás 1987-ben elérte a 70-90 ezer tonnát. Németország már 1991-ben betiltotta az *atrazine* használatát, mivel a megengedett határértéket meghaladó koncentrációban volt kimutatható felszín alatti és ivóvizekből (Tappe et al. 2002), majd vízszennyező tulajdonsága miatt egyre több országban megtiltották az alkalmazását. Ennek ellenére a 2000-es évek elejéig az *atrazine* volt a világon a legnagyobb mennyiségben eladott gyomirtó szer. 2001-ig a peszticid-eladási lista élén állt, majd az Egyesült Államokban a második helyre csúszott a *glyphosate* után (US EPA 2004). Az évtizedeken keresztül történő nagymértékű *atrazine*-felhasználásnak két fontos következménye lett. Egyrészt az 1970-es években elkezdtek megjelenni az *atrazine*-rezisztens gyomnövények, mely mára jelentős méreteket öltött. Az International Survey of Herbicide Resistant Weed adatbázisa jelenleg 231 *atrazine*-rezisztens gyom-biotípusról számol be (<http4>). Másrészt a nagymértékű, folyamatos és kiterjedt alkalmazás miatt mára az *atrazine* és bomlástermékei globálisan előfordulnak a környezeti elemekben, ill. koncentrációjuk gyakran meghaladja a növényvédő szerekre vonatkozó 0,1 µg/L-es európai határértéket. A felszíni és felszín alatti vizek megóvása érdekében 2003. október 13-án számos európai országban betiltották az *atrazine* használatát, ennek ellenére egy héttel később az US EPA jóváhagyta az USA-ban a gyomirtó szer további alkalmazását (US EPA 2006a)

A kedvező tartalmú tudományos jelentések ellenére az Európai Unió 2004. március 10-i határozatában (2004/248/EK) kimondta az *atrazine* hatóanyagot tartalmazó növényvédő szerek engedélyének visszavonását. Magyarország maximális derogációt kért, „nélkülözhetetlen használat” („*essential use*”) címén. Az utolsó *atrazine* tartalmú készítményt 2007.12.31-ig lehetett felhasználni (Pethő et al. 2011).

Azokban az országokban, ahol az *atrazine* használata nem engedélyezett, a *terbuthylazine* hatóanyagot alkalmazzák gyakorlatilag az *atrazine* helyettesítőjeként. A *terbuthylazine*, mint új klór-triazin gyártását az 1970-es években kezdte meg a Ciba-Geigy és Gardoprim® márkanév alatt forgalmazták az Egyesült Államokon kívül. A *terbuthylazine*-t először a *terbutryn*-nal együtt használták burgonya gyomirtásában, majd a *terbumeton*-nal szőlőben és gyümölcsösökben. További fontos része volt Európa és Dél-Afrika egyes területein kukoricában büdöskék irtásában, melyekkel szemben az *atrazine* kevésbé bizonyult hatékonynak. Az Egyesült Államokban az *atrazine* mellett a *terbuthylazine* felhasználás viszonylag kismértékű, és noha 1975-ben regisztrálták az Egyesült Államokban herbicidként, kukorica gyomirtására nem árusítják, ugyanis az *atrazine*-nél kevésbé hatékony egyes széles levelű gyomok és fűfélék ellen

(Heri et al. 2008). Algaellenes hatása miatt 1986-ban algaölő, mikroba ellenes végfelhasználói terméként regisztrálták vízhűtő rendszerekben történő használatra (US EPA 1995a). Európai regisztrációjára kukoricára Németországban 1983-ban, Ausztriában 1984-ben, Olaszországban 1987-ben, Hollandiában 1990-ben, Dániában 1993-ban került sor. Európában kulcsfontosságú triazin herbiciddé vált az *atrazine* betiltása óta. Európában a kukorica termőföldek közel 60%-a van *terbuthylazine*-nal kezelve. Több mint 45 országban alkalmazzák és a mai napig kulcsszerepet tölt be kukorica, cirok, zöldborsó, bab, csillagfürt, csemege- és borszőlő, almafélék és citrusfélék gyomirtásában (Heri et al. 2008).

### 3.3 Vonatkozó határértékek, *atrazine* és *terbuthylazine* jelenléte környezeti elemekben

1991-ban az US EPA az *atrazine* ivóvízben megengedett maximális szintjét (MCL<sup>3</sup>) 3 µg/L-ben (http5), Kanadában 5 µg/l-ben (MAC<sup>4</sup>) (Health Canada 1993) az Egészségügyi Világszervezet (WHO) nemzetközi irányelvben 2 µg/L koncentrációban határozta meg (WHO 1996). Az Európai Unió az egyes peszticidekre egységesen 0,1 µg/L, összes peszticidre vonatkozóan 0,5 µg/L koncentrációjú határértéket határozott meg az ivóvizekre vonatkozóan (98/83/EK). Hazánkban az ivóvizekre megállapított határérték megegyezik az Európai Unió szabályozással, mely 0,1 µg/L koncentrációban maximalizálta az *atrazine* mennyiségét. *Terbuthylazine*-ra mindössze a WHO határozott meg 7 µg/L értékben maximális koncentrációt ivóvízre vonatkoztatva (WHO 2007).

Az *atrazine* előfordulása az élővizekben a mezőgazdasági területekről elfolyó, a herbiciddel szennyezett vizeknek (*runoff*) köszönhető. A talajra jutó peszticidek sorsát, valamint a talajban maradó mennyiségüket különféle tényezők befolyásolják, úgy, mint fotobomlás, kémiai és biológiai lebomlás, adszorpció, kapilláris áramlás, le- és kimosódás, párolgás, növények által történő felvétel, stb. Az *atrazine* féléletidejét (DT<sub>50</sub>) a különböző talajtípusok és az eltérő környezeti körülmények nagymértékben befolyásolják. A DT<sub>50</sub> érték tavasszal történő alkalmazás esetén 2,5-3 hónapnak bizonyult talajban (Frank&Siron 1985), őszi alkalmazás során 198 nap volt (Frank et al. 1991). Vízben egyes források lényegesen lassabb degradációról számolnak be, az *atrazine* felezési ideje 200, sőt néhol a 400 napot is meghaladta (Mersie et al. 1998). 1993-ban végzett tanulmány szerint a herbicidek közül az *atrazine* fordult elő a legtöbb esetben, a talaj felső rétegében (Károly et al. 1999). A talaj szervesanyag tartalma, valamint mind a huminsavak, mind a fulvosavak magas affinitást mutatnak a triazinokhoz való kötődésre

<sup>3</sup> Maximum Contaminant Level

<sup>4</sup> Maximum Acceptable Concentration

(Piccolo et al. 1992). A talajoldat fulvosav tartalma komplexeket tud képezni az *atrazine*-nal, illetve katalizálhatja annak hidrolízisét hidroxiformákká. Az ásványi talajok legfőbb szervesanyag tartalmát a huminanyagok adják, melyek számos mechanizmus révén képesek megkötni a triazin vegyületeket. Az *atrazine* a szerves anyagok amid- és karboxilcsoportjaival hidrogénkötéseken keresztül képez komplexeket (Laird&Koskinen 2008). Mint általános szabály, megállapítható, hogy a triazinok szorpciója talajban a pH érték csökkenésével nő, 4-6 közötti talaj pH esetén jóval nagyobb mennyiségű *atrazine* kötődik meg, mint 7, vagy annál magasabb pH-n (Liu et al. 1995).

Az *atrazine*-t és transzformációs termékeit vizsgálva azt tapasztalták, hogy a talaj felszíni- valamint felszín alatti rétegeiben a legnagyobb mobilitás a homokos, valamint homokos agyagos-vályogtalajokban figyelhető meg, melyeknek a legkisebb a szervesanyag tartalma. Az egyes vegyületek mobilitása a következőképpen alapul: deetil-*atrazine* > *atrazine* > deizopropil-*atrazine* > hidroxil-*atrazine*, mely szoros összefüggést mutatott a felszín alatti vizek monitoring eredményeivel (Kruger et al. 1996, Ma&Selim 1996).

Számos tanulmányt készítettek, melyekből kiderül, hogy az *atrazine* az egyik leggyakoribb felszíni víz- és talajszennyező, megtalálható talajvizekben, ivóvizekben, valamint a légkörben is előfordul. (Bintein&Devillers 1996, Goolsby&Battaglin 1993, Goolsby et al. 1993, Schottler&Eisenreich 1997, Thurman et al. 1991, 1992, 1998), de a csapadékkal több száz kilométeres távolságra is elszállítható (Bossi et al. 2002, Brun et al. 2008, Chevreuil&Garmouma 1993, Goolsby et al. 1997, Sanusi et al. 2000, Thurman&Cromwell 2000), így az eredeti alkalmazás helyétől távol is képes szennyezést okozni; kimutatták már a Bering és Chukchi tengereknél gyűjtött arktiszi jégmintákból, valamint ködből is (Chernyak et al. 1996). Németországban az 1991-es betiltása után közel két évtizeddel még mindig az *atrazine* (egyik dealkilált metabolitjával, a deetil-*atrazine*-nal együtt) volt az egyik leggyakrabban kimutatható peszticid felszín alatti vizekben (LAWA 2003, Tappe et al. 2002, Vonberg 2014). Egy 2013-as felmérésben Európai országokban (Olaszország, Spanyolország, Görögország, Törökország) vizsgálták a betiltást követő években (2009-2011) a part menti vizek *atrazine* tartalmát, a tanulmány eredményei azt mutatták, hogy alacsony koncentrációban, de minden vizsgált területen detektálható volt a vegyület (Nödler et al. 2013).

Az *atrazine* a felszín alatti vizekben általában alacsonyabb koncentrációban van jelen, mint a felszíni vizekben, viszont a mélyebb rétegekbe beszivároghatva az úgynevezett másodlagos perzisztencia miatt rendkívül hosszú ideig képes megmaradni (Tierney et al. 1998). Az *atrazine*-t szinte minden olyan felszíni vízben detektálták, melynek környezetében a mezőgazdasági tevékenységek során alkalmazták. A legmagasabb koncentrációt a felszíni vizekben az alkalmazást követő első két hónapban mérték, az ősz és a tél folyamán csökkent a kimutatható

mennyiség (Frank et al. 1991, Thurman et al. 1992). Magyarországon a 1994 és 2000 között az *atrazine* volt az egyik leggyakoribb felszíni vízszennyező hazánkban (Székács et al. 2015). Egy 2014-ben végzett felmérés a Zágráb és környéke felszíni-, felszín alatti és ivóvizét vizsgálta 13 herbicid hatóanyagra. Eredményei szerint szintén az *atrazine* volt a leggyakrabban detektált vegyület ivóvízben (minták 84%-ában) és felszín alatti vizekben (minták 61%-ában) 5-68 ng/L koncentrációkban, melyet harmadikként (az *s-metolachlor* után) követett a *terbuthylazine* az ivóvizek 45%-ában (20 ng/L koncentrációig) és a felszín alatti vizek 26%-ában (25 ng/L-ig). A felszíni vizekben szintén előkelő 2. helyen végzett a *terbuthylazine* a minták 49%-ában (690 ng/L-ig!), ill. harmadikként az *atrazine* (minták 30%-ában, 18 ng/L-ig). A jelenleg használható *terbuthylazine* esetében megfigyelhető volt a jellegzetes áprilistól augusztusig tartó koncentráció-csúcs (Fingler et al. 2017).

1991-es, az Egyesült Államokban végzett tanulmány alapján a maximálisan kimutatott koncentráció a talajvizekben 2,3 µg/L volt (Kolpin et al. 1998). Magyarországon 1998-ban megjelent közlemény szerint a 17 megvizsgált nyersvíz minta közül 3 *atrazine* tartalma meghaladta az Európai Unió által meghatározott határérték szintjét, a 0,1 µg/L-t (Kárpáti et al. 1998).

Magyarországon az 1996-1997-ben végzett talajszennyező felvételezések szerint a triazin típusú gyomirtók (*terbumeton*, *terbutryn*, *terbuthylazine*, *atrazine*) előfordulása volt a meghatározó a talajok A-szintjében. A megvizsgált 46 talajminta átlagos szermaradék-koncentrációja az A-szintben 280-290 µg/kg volt *terbuthylazine*-ra vonatkoztatva (Darvas & Székács 2006).

Talajokba bekerülő és jelenlévő *terbuthylazine* sorsával, viselkedésével kapcsolatban a környezeti aggodalmak egyre inkább nőnek, mivel deetil-*terbuthylazine* (DET) metabolitjával együtt gyakran az EU-s 0,1 µg/L határérték feletti koncentrációban van jelen felszíni- és talajvizekben (Grenni et al. 2012). Környezeti vizekbe, mint például folyókba, tengerekbe, talajvizekbe kerülve az *atrazine* mellett a *terbuthylazine* jelentős perzisztenciával rendelkezik. Tengervizekben 76 nap a DT<sub>50</sub> értéke, folyóvizekben 196 nap, talajvizekben 366 nap (Navarro et al. 2004).



### 3.4 Nem célszervezetekre gyakorolt biológiai hatások

#### 3.4.1 Atrazine

##### 3.4.1.1 Toxicitás, karcinogenitás, immunszuppresszív hatás

Emberre és állatokra nézve az *atrazine* enyhén-közepesen mérgező vegyület, emlősökre orális, dermális és inhalációs expozíció során megállapított LD<sub>50</sub> értékeket és néhány vízi szervezetre az LC<sub>50</sub> értékeket az 1. táblázat foglalja össze. Akut mérgezés esetén a tünetek többek között hasi fájdalmak, hasmenés, hányás, szemirritáció, nyálkahártya-irritáció, izomgyengeség, bőrreakciók (Stevens&Sumner 1991). Fischer (F344) nőstény patkányokkal végzett etetési kísérletek során (0,375 és 750 mg/ttkg *atrazine* 126 héten keresztül) az emlőmirigyek és reproduktív szervekben tumorok kialakulását figyelték meg (Pintér et al 1990). Nőstény Sprague-Dawley patkányoknál 22,5 mg/ttkg *atrazine* az ivarzási ciklus meghosszabbodását idézte elő és dózis-függő módon növelte meg a plazma ösztadiol szintjét, valamint emlő- és hipofízis tumorok kialakulását eredményezte (Wetzel et al. 1994). További vizsgálatok szerint prenatális *atrazine* expozíció rágsálókban eltérő emlőfejlődést okoz, mely a későbbiekben a felnőtt egyedekben megnöveli az emlőrák kialakulásának esélyét (Enoch et al. 2007, Rayner et al. 2005, Rayner et al. 2007). Az a kevés adat, amely a foglalkozási eredetű humán *atrazine* expozíció hatásával foglalkozik, azt mutatja, hogy az *atrazine* expozíció összefüggésben lehet emberben rák, különösen non-Hodgkin limfóma előfordulásának gyakoriságával (IARC 1999, Sass&Colangelo 2006). Más vizsgálatok arról számolnak be, hogy az *atrazine* egyéb vegyületekkel egymás szinergistáiként tudnak viselkedni, növelve ezzel azok toxikus hatását, egy vizsgálat szerint férfiakban non-Hodgkin limfóma kialakulásához még nagyobb valószínűséggel járul hozzá az *atrazine* egyéb peszticidek jelenlétében (De Roos et al. 2003). IEC-6 humán epitél bélhámsejteket vizsgálva már 1 µM *atrazine* sejtproliferációt indukált (Greenman et al. 1997). Azonban a vegyületet aUS EPA „nem valószínű, hogy emberben rákkeltő” kategóriába (http6), az IARC jelenleg 3, azaz humán karcinogenitás szempontjából nem osztályozható kategóriába sorolja. Utóbbi szervezet 1999-ben minősítette át az *atrazine*-t, addig (1991 óta) 2B, azaz emberben feltételezhetően rákkeltő kategóriában foglalt helyet (IARC 1999).

Az *atrazine* immunszupresszor hatásáról több tanulmány is beszámol. Liskova és mtsai (2000) vizsgálatuk során 10 napos egér etetési kísérletben 25 %-os csökkenést figyeltek meg az IgM mennyiségében. Forson és Storfer (2006a) leírták, hogy az *atrazine* csökkenti a perifériás leukocita szintet a tigris szalamandránál (*Ambystoma tigrinum*), ezáltal megnövekedett a lárvák fogékonysága ranavírussal szemben. Vörösfülű ékszerteknősnél szintén immunszupresszív

hatásokat tapasztaltak (Soltanian et al. 2016). Kételtűekben *atrazine* expozíció hatására romlottak az immunfunkciók és megnövekedett az egyedek fogékonysága különböző betegségekkel szemben (Brodkin et al. 2007, Forson et al. 2006a, b, Hayes et al. 2006, Kiesecker et al. 2002, Rohr et al. 2008 ). Rágcsálók esetében szintén az immunfolyamatok leromlását (Cantemir et al. 1997, Filipov et al. 2005, Karrow et al. 2005, Porter et al. 1999, Pruett et al. 2003, Rowe et al. 2006), valamint hiperszenzitivitás (Rowe et al. 2006) kialakulását figyelték meg *atrazine* expozíció hatására. Humán perifériás vérből származó limfocitákat vizsgálva *atrazine* expozíció a természetes ölüsejtek (NK-sejtek) az idegen sejtek lízisét előidéző lítikus granulomok kibocsátását csökkentette le, anélkül, hogy az NK-sejtek célsejttel történő stabil konjugátumképződését gátolta volna (Rowe et al. 2007).

**1. táblázat – Az atrazine akut toxicitási értékei egyes emlősökre és vízi szervezetekre.**

Mérési végpont	Szervezet	Mennyiség	Forrás
Orális LD <sub>50</sub>	patkány	1869-3090 mg/kg	Tomlin (2000)
	egér	1332-3992 mg/kg	Tomlin (2000)
	nyúl	750 mg / kg	http7
Dermális LD <sub>50</sub>	nyúl	7500 mg / kg	http7
	patkány	>3000 mg / kg	http7
Inhalációs LD <sub>50</sub> 1 órás expozíció esetén	patkány	>0,7 mg / L	Stevens&Sumner (1991)
Inhalációs LD <sub>50</sub> 4 órás expozíció esetén	patkány	5,2 mg / L	Kidd et al. (1991)
LD <sub>50</sub>	guppi	4,3 mg / L	Tomlin (2000)
LC <sub>50</sub>	<i>Ptychadena bibroni</i>	0,23– 0,43 mg/L	Ezemonye L.I.N.&Tongo I., (2009)
Növekedés gátlás LC <sub>50</sub>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0,008 mg/L	http8
LC <sub>50</sub>	<i>Daphnia magna</i>	0,415 mg/L	TerraTox™ Vibrio fischeri and Aqua Databases

### 3.4.1.2 Endokrin diszruptor hatás

Az *atrazine* hormonrendszert megzavaró hatásairól mára óriási számú vizsgálati eredmény áll rendelkezésre. A vegyület közvetlenül nem képes az androgén- és ösztrogénreceptorokhoz kötődni (Kojima et al. 2004, Roberge et al. 2004, Suzawa&Ingraham 2008). Az *atrazine* ED hatását *in vitro* vizsgálva kiderült, hogy a vegyület foszfodiészteráz-inhibitor hatással rendelkezik, mely enzim gátlásakor megemelkedik a cAMP szintje (Roberge et al. 2004, Sanderson et al. 2002), ez pedig a szteroidogenezisben a tesztoszteron ösztrogénekké alakítását végző aromatáz enzim indukcióját okozza a *CYP19* gén transzkripciójának fokozásával, valamint a vegyület ligand lehet az SF-1 sejtmagreceptor számára is, mely az aromatáz promóterhez (*ArPII*) kötődve szintén a génexpressziót indukálja (Fan et al. 2007). Az *atrazine*, valamint két leggyakoribb bomlástermékének, a deetil-*atrazine* (DEA) és a

deizopropil-*atrazine* (DIA) aromataz enzim aktivitást növelő, illetve *CYP19* gén expresszióját indukáló hatását is számos kísérletben kimutatták H295R humán adrenokortikális karcinóma sejtvonalon (Heneweer et al. 2004, Sanderson et al. 2000, 2001, 2002). Powell és mtsai (2011) vizsgálata szerint az *atrazine* már relatíve alacsony koncentrációban (625 ppb) immortalizált (korlátlan ideig szaporodni képes) humán májsejtekben (HepG2) a sejtosztódási ciklus szabályozását képes volt megzavarni.

Számos kutatási eredmény szerint *in vivo* gátolta a tesztoszteron-termelést miközben nőtt az ösztrogén produkció. Ezt a hatást megfigyelték halakban (Moore et al. 1998, Spano et al. 2004), kétéltűekben (Hayes et al. 2002a, 2003, 2005, Tavera-Mendoza et al. 2002), hüllőkben (Crain et al. 1997, Keller et al. 2004) és emlősökben is (Babic-Gojmerac et al. 1989, Friedmann 2002, Heneweer et al. 2004, Sanderson et al. 2002, Stoker et al. 2000, Trentacoste et al. 2001, Wetzel et al. 1994, ). Ennek az eredménye a legtöbb vizsgálatban a lecsökkent tesztoszteron koncentráció, és a spermaszám csökkenése a fertilitás leromlásával együtt. Az *atrazine* hatására megemelkedett ösztrogénszint halak, kétéltűek és hüllők esetében a hímek feminizálódását okozta. Az elnőiesedett hím halak és kétéltűek petéket raktak (Hayes et al. 2002b, 2002c, 2010), néhány hím egyedben petefészkek alakult ki (hermafroditizmus), ezen hatásokat a környezetben is előfordulóval releváns koncentrációknál is tapasztalták (Hayes et al. 2002a, Hayes 2005, Hayes et al. 2006).

### 3.4.1.3 Mitokondriális diszfunkció

Az utóbbi egy-két évtizedben rohamosan nő azoknak a kutatásoknak és publikációknak a száma, melyek a különböző szerves és szervetlen szennyezőanyagok anyagcserére, valamint az anyagcserezavarokkal összefüggésbe hozható betegségek, kórállapotok kialakulására gyakorolt hatásait vizsgálja.

Számos tanulmány fókuszál a mitokondriális diszfunkció és oxidatív stressz kialakulására, melyek a figyelem középpontjában álló obezitás, inzulin-reszisztencia és diabétesz (Sivitz&Yorek 2010), Parkinson-kór (Winklhofer&Haas 2010), valamint az autizmus spektrumbetegségek (Frye&Rossignol 2012, Siddiqui et al. 2016) kialakulásában jelentős szerepet játszanak. A mitokondriumok sejtjeink ATP előállító szervecskéi, melyekben különböző vegyületek oxidációja során az elektrontranszport-lánc (ETC) segítségével kialakuló protonkoncentráció gradiens révén ATP képződik az ATP szintázon keresztül oxidatív foszforilációval, miközben molekuláris oxigén redukálódik vízzé. Az elektronok továbbításában számos elektronhordozó vesz részt, melyek 4 komplexet alkotnak. Egyes vegyületek képesek lehetnek az elektrontranszport vagy az oxidatív foszforiláció gátlásán/szétkapcsolásán keresztül káros hatást gyakorolni a mitokondriumok energiatermelő képességére.

Lim és mtsai (2009) megfigyelve, hogy az USA „kórosan elhízott” államai és az *atrazine*-t legnagyobb mennyiségben alkalmazó államok között megdöbbentően nagy az átfedés, az *atrazine* mitokondriumokra, energia- és zsíryanycserére gyakorolt hatását vizsgálták. Feltételezésük szerint, ha az *atrazine* a kloroplasztiszbán található PSII fotoszintetikus rendszer tilakoid membránjának plasztokinon kötőhelyéhez képes irreverzibilisen kötődni, valamint a mitokondriális ETC I-es és III-as komplexének hasonló kinon-kötőhelyei vannak, elképzelhető, hogy az *atrazine* képes ezekhez a mitokondriális kötőhelyekhez kapcsolódni, ezáltal pedig csökkenteni az oxidatív foszforiláció mértékét. Spargue-Dawley patkányokat vizsgálva azt találták, hogy kis koncentrációjú, krónikus orális *atrazine* expozíció (30 és 300 µg/ttkg/nap) hatására megnőtt az állatok testtömege, a vizcerális zsírszövet mennyisége, valamint az izom és máj lipid-akkumulációja, ill. a sejtek inzulin-rezisztenciája. Az *atrazine* hatására az állatok talpemelő izmának elektronmikroszkópos képe azt mutatta, hogy az izomsejtekben a mitokondriumok megduzzadtak, valamint a belső membrán lemezszerű betűródéseinek (krisztáinak) egy része megsemmisült és csökkent az oxidatív foszforiláció mértéke. Eredményei alapján tehát az *atrazine* – főként magas zsírtartalmú étrend esetén – károsítja a mitokondriális funkciókat, hatást gyakorol az inzulin szignalizációra, valamint növeli az inzulinrezisztencia és elhízás kialakulását (Lim et al. 2009).

A diabétesz mellitus kialakulásában szerepet játszó oxidatív stresszt vizsgálva normál és diabéteszes Wistar patkányokban rövid távú, 300 µg/ttkg/nap *atrazine* expozíció szintén testtömegnövekedést okozott, valamint hatására megemelkedett a lipidperoxidáció során keletkező malondialdehid (MDA), illetve a reaktív gyökök ártalmatlanításában szerepet játszó szuperoxid-dizmutáz (SOD), glutation-peroxidáz (GPx) és kataláz (CAT) enzimek mennyisége máj és veseszövetekben. Továbbá hatására megnöttek a máj- és vesekárosodást jelző biomarkerek koncentrációi, mint pl. az aszpartát-aminotranszferáz (AST), alanin-aminotranszferáz (ALT) és alkalikus-foszfátáz (ALP), valamint a kreatinin és urea szint (Jestadi et al. 2014).

Az *atrazine* mitokondriumokra gyakorolt toxikus hatását HepG2 és L6 máj-, illetve izomsejteken is kimutatták, melyekben a mitokondriális transzkripciós faktor A TFAM (mitokondriális transzkripciós faktor A) és a szirtuin 1 (SIRT1) gének expressziója jelentősen lecsökkent (Sagarkar et al. 2016). A SIRT1 fehérje (egy konzervált NAD-dependens deacetyláz) szerepet játszik többek között a normális glükóz homeosztázis fenntartásában, valamint az inzulin szekrécióban (Sun et al. 2007).

### 3.4.2 *Terbutylazine*

#### 3.4.2.1 *Toxicitás, karcinogenitás*

Viszonylag régóta történő alkalmazása ellenére meglepő, de a *terbutylazine* hatóanyagról viszonylag kevés számú átfogó tanulmány készült, a US EPA *terbutylazine*-ra vonatkozó re-regisztrációs dokumentuma 1995-ben, az EFSA által készített kockázatbecslés 2001-ben készült el. Ezek szerint a *terbutylazine* relatív alacsony akut toxicitással bír, hatásai: mérsékelt szemirritáció, gyenge bőrirritáció. Szubkrónikus, patkányokon végzett toxicitási vizsgálatok során csökkent testsúlynövekedést, csecsemőmirigy-, vese-, májtömeg csökkenést figyeltek meg; nyulakban szintén csökkent testsúlynövekedés és táplálékfelvétel, nehézlégzés, bőrirritáció jelentkezik. Krónikus toxicitási vizsgálatokban, egerekben és patkányokban az előzőekhez hasonló tünetek voltak megfigyelhetők. LD<sub>50</sub> értékek akut toxicitási vizsgálatban patkányra orális expozíció során 1000-1590 mg/ttkg, dermálisan >2000 mg/ttkg, inhalációs úton >5,3 mg/L levegő/4 h kiütettség volt (EFSA 2011). Madarakra >2510 mg/ttkg volt az LD<sub>50</sub>, szivárványos pisztrángra 3,4 mg/L, kékkopoltyús naphalra 7,5 mg/L, *Daphnia magna*-ra 50,9 mg/L az LC<sub>50</sub> érték (US EPA 1995). Vízi szervezetekre erősen toxikus: algákra és vízínövényekre EC<sub>50</sub> érték 12 és 12,8 µg/L (WHO 1998), kóktélgarnélára (*Pandalus borealis*) LC<sub>50</sub> érték 0,11 mg/L (US EPA 1995).

Míg az IARC listáin nem szerepel, a US EPA karcinogén hatású anyagok listájának D csoportjában foglal helyet, mely szerint humán karcinogenitási kategóriákba nem sorolható be (US EPA 1995). Ezzel szemben Cova és munkatársai (1996) szerint a *terbutylazine* gyomorba jutása során a gyomorsav hatására nitrózamin-származékok képződnek, amelyek a bizonyítottan rákkeltő vegyületek családjába tartoznak. A jelentések alapján nem bizonyult genotoxikusnak az anyag.

Mladinic és mtsai 2012-es kutatásai alapján azonban humán limfocita sejteket megnyújtott, 14 napos kísérletben vizsgálva a *terbutylazine comet-assay*<sup>5</sup>-vel mérve DNS károsodást, illetve FISH<sup>6</sup>-comet-tel detektálva *c-Myc*<sup>7</sup> és *TP53*<sup>8</sup> gének strukturális integritásának károsodását okozta.

<sup>5</sup> DNS törés kimutatására alkalmas, gélelektroforézisen alapuló teszt

<sup>6</sup> Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

<sup>7</sup> Regulátor gén, mely többek között a sejtciklusban, apoptózisban és transzformációs folyamatokban vesz részt ([http11](http://11))

<sup>8</sup> Tumorsupresszor gén, mely a sejtciklust is szabályozza ([http12](http://12))

### 3.4.2.2 *Endokrin diszruptor hatás*

Két 2014-es kutatás azt mutatta, hogy a vegyülettel kezelt (106,5 mg/ttkg/nap) nőstény Han Wistar (Handa 2014) és SD patkányokban (Stump 2014) a *terbuthylazine* (és *atrazine*) hatására lecsökkent az ösztadiol-indukált LH (luteinizáló hormon) termelés (http9, http10).

Újabb vizsgálatok szerint a *terbuthylazine* az *atrazine*-hoz hasonlóan szintén rendelkezik endokrin diszruptor hatással: koncentráció-függő módon JEG-3 (humán koriokarcinóma) sejtvonalban gyenge aromataz induktorként viselkedett (Kjeldsen et al. 2013). Továbbá nem elhanyagolható az a tény, hogy a szerkezeti hasonlóság miatt a *terbuthylazine* dealkilációja során részben ugyanazok a bomlástermékek keletkeznek (3. ábra), mint az *atrazine*-nál, melyek közül a DIA, mindkét vegyület metabolitja aromataz induktornak bizonyult H295R sejtekben (Sanderson et al. 2001). Utóbbi sejtvonalat használva Taxvig és mtasi (2013) azt találták, hogy a *terbuthylazine* 6,3  $\mu\text{M}$ -os LOEC (legkisebb ható koncentráció) értékkel igen erős hatást gyakorolt a progeszteron termelés növekedésére, valamint a tesztoszteron produkciót is indukálta (LOEC 12,5  $\mu\text{M}$ ). Az ösztadiol termelést szintén megnövelte a *terbuthylazine* már 3,1  $\mu\text{M}$  koncentrációnál is, mely alapján felmerül a gyanú, hogy az *atrazine*-hoz hasonlóan aromataz induktor hatást gyakorolhat a H295R (humán adrenokortikális karcinóma) sejtvonalban is.

A fent bemutatott fejezetek alapján tehát látható, hogy az *atrazine* és *terbuthylazine* igen széleskörű, sokszor láncreakció szerű biológiai hatásokat idéz elő a nem célszervezetekben, sokszor már igen alacsony koncentrációban is. Ennek különösen nagy jelentősége az ökoszisztémák egyes tagjainak a környezeti elemekben kis koncentrációban jelen lévő *atrazine*-nal és *terbuthylazine*-nal való hosszú távú expozíciója során van, melynek elképzelhetetlenül nagy számú káros kimenetele lehet nem csupán 1-1 populációra, de azok és környezetük bonyolult hálózatát képező ökoszisztémáinak jelenleg ismert és normálisnak tartott működésére is.

### 3.4.3 *Nemzetközi szervezetek állásfoglalása*

1994-ben a US EPA alapos biztonsági vizsgálatnak vetette alá a triazine herbicideket (magukba foglalva az *atrazine*-t, *simazine*-t és *cyanazine*-t) egy ún. „Special Review” keretében, mely során többszáz kutatási eredményt elemeztek. Ezzel egyidőben, az *atrazine* átfogó felülvizsgálat kezdődött meg Ausztráliában, az Egyesült Királyságban (az Európai Unió részére) és Franciaországban. A WHO égisze alatt működő IARC (1999) szintén megvizsgálta az *simazine*-t és *atrazine*-t. A vizsgálatok eredményei szerint biztonságos a triazin herbicidek használata. Az Egyesült Államokban a US EPA 2000-ben összehívott egy tudományos tanácsadó testületet (Scientific Advisory Panel, továbbiakban SAP), hogy foglaljon állást az *atrazine*

karcinogén mivolta mellett/ellen. Az SAP megállapítása az volt, hogy az *atrazine* nem valószínű, hogy emberben rákkeltő hatással bír, mely nyomán a US EPA 2000-ben a „nem valószínű, hogy emberben rákkeltő” kategóriába sorolta az vegyületet (US EPA 2000). Ez az állásfoglalás változatlanul szerepelt az *atrazine* 2003-as időszakos kockázatbecslési jelentésében (US EPA 2003). 2006-ban, a klór-triazinok átfogó tudományos felülvizsgálata után a US EPA állásfoglalása szerint „elfogadható bizonyossággal a *simazine*, *atrazine* és *propazine* használatának nincs káros hatása az Egyesült Államok lakosságára, újszülöttekre, gyermekekre, vagy egyéb fogyasztói alcsoportokra” (US EPA 2006b,c). Továbbá, egy a kormányzat által finanszírozott tanulmány szerint, melyet a National Institute of Health, National Cancer Institute, National Institute of Health Science és a US EPA végzett el, nem található kapcsolat a rákos esetek előfordulása és az *atrazine* expozíció között (Alavanja et al 2003, Engel et al. 2005, Rusieczki et al 2004).

Az EU állásfoglalása szerint elegendő a bizonyíték arra, hogy az *atrazine* csak és kizárólag nőstény SD patkányokban okozza az emlők daganatos elváltozását, ezért ezek az adatok emberre nem relevánsak, az *atrazine* karcinogénként való besorolása tehát nem megfelelő (UK Rapp Mon 2000). Az IARC hasonlóképp nyilatkozott, azaz az *atrazine* expozícióval összefüggő emlő tumorok kialakulása hormonális úton történik és kizárólag nőstény SD patkányokban, valamint egyéb daganattípusok kialakulásának gyakorisága nem emelkedik hatására, ezek az adatok tehát nem relevánsak az emberre nézve. 1999-ben az IARC 3-as csoportba sorolta az *atrazine*-t, mely csoport az jelenti, hogy a kutatási adatok emberre nézve nem elegendők a karcinogenitás megállapításához, illetve még ha az állatok tekintetében a kísérletek eredményei elegendők is, a teszttalokban megfigyelt hatásmechanizmusok nem alkalmazhatóak emberre vonatkoztatva (IARC 1999).

Előzőekkel megegyező következtetésre jutott Ausztráliában az APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority) is, melynek 2004-es jelentése szerint azok az adatok, melyek szerint az emlőtumorok kialakulásának valószínűsége megnövekszik SD patkányokban nagymértékű *atrazine* expozíció hatására, emberre nem vonatkoztathatóak. Továbbá az APVMA szintén kijelentette, hogy „Sprague-Dawley patkányokban leírt hatásmechanizmus alapján az *atrazine* nem valószínű, hogy endokrin diszruptor lenne emberben”. Az *atrazine* kételtűekre gyakorolt potenciális hatásáról szóló adatok alapján megállapította, hogy valószínűtlen, hogy az *atrazine* káros hatást gyakorolna az ausztrál kételtű populációkra a jelenlegi expozíciós szintek mellett (APVMA 2004).

Az Egyesült Királyság által 1996-ban közzétett jelentése ez előzőekhez hasonló tartalommal bír, miszerint „jó növényvédelmi gyakorlat alkalmazása mellett az *atrazine*

használata nem okoz káros hatást az emberi vagy állati egészségre, ill. nem gyakorol elfogadhatatlan hatásokat a környezetre” (UK Rapp Mon 1996a, 1996b).

Az Európai Unióban az *atrazine*-t elsősorban vízszennyező tulajdonsága miatt tiltották be, míg a *terbuthylazine* jelenleg is használatos herbicid hatóanyag, azonban a nemzetközi szervezetek által kiadott állásfoglalások szinte elbagatellizálják ezeknek a vegyületeknek az egyéb biológiai kockázatait, miközben aktív felhasználásuk, környezetbe történő kijuttatásuk, egy-egy környezeti elemekben, élelmiszer alapanyagokban történő akkumulációjuk, majd táplálékláncba való bekerülésük jelenleg is zajlik.

### 3.5 Mikrobiális degradáció

A biodegradáció fogalma tágabb értelemben tartalmazza a mikroszervezetek által végzett biológiai-biokémiai folyamatok sorozatán keresztül megvalósuló, lebomlási (katabolitikus) és átalakítási (transzformációs) eljárásokat. A biodegradáció két típusa: *i) teljes biodegradáció (mineralizáció)*, melynek során a kiindulási szerves vegyületekből szén-dioxid, víz, ártalmatlan sók és biomassza keletkezik. A mikroszervezetek számára a lebontási folyamatok szén- és/vagy energiaforrást nyújtanak; *ii) részleges biodegradáció*, mely – során a kiindulási anyagoknál toxikusabb veszélyesebb vegyületek is keletkezhetnek – további három csoportra osztható: *a) első típus:* lebontáshoz, átalakításhoz szükséges valamely enzim hiányzik, ennek következtében a lebontási folyamat megszakad, valamilyen közti terméknel, vegyületnel és a képződött energiát a mikroszervezetek felhasználják; *b) második típus:* kometabolizmus, a lebontási folyamat során a kiindulási vegyület részlegesen oxidálódik, azonban a lebontásban résztvevő mikroszervezetek a keletkező energiát nem használják fel; *c) harmadik típus:* a mikroorganizmusok tevékenysége során a kiindulási anyagnál összetettebb és/vagy stabilabb vegyületek keletkeznek (Perei et al. 2012).

A környezetvédelmi gyakorlatban a környezeti elemeket szennyező xenobiotikumok eliminációjára alkalmas technológiák egy csoportját a biológia úton történő kármentesítés képezi, melyen belül a mikroorganizmusok különösen nagy szerepet játszanak. A mikrobiális úton történő lebontás több módon valósulhat meg, úgymint spontán biodegradáció, mely során a szennyezett közeg eredeti mikroközössége végzi a lebontást; a támogatott biodegradáció, mely során a közegben található szennyezőanyag biológiai lebontásához szükséges fizikai és kémiai paramétereket optimalizáljuk. Ezen módszerek esetében azonban fennáll a veszélye annak, hogy fakultatív patogén mikroorganizmus(oka)t szaporítunk fel szándékukon kívül és/vagy az őshonos mikrobaközösség hiányos enzimrendszere miatt a lebontás elakad. Harmadik lehetőség bioaugmentáció, mely során faj szinten identifikált, humán- és környezetegészségügyi



kockázatot nem jelentő, ismert szennyezőanyag bontási potenciállal rendelkező mikroorganizmusokat jutattatunk a közegbe nagy csíraszámú oltóanyag formájában (Perei et al. 2012).

Biodegradációs folyamatokban baktérium konzorciumok alkalmazása célra vezető lehet, mert fenn áll a lehetősége, hogy nagyobb hatékonysággal képesek lebontani a különböző szennyező anyagokat, ennek a következő okai is lehetnek:

- Az egyik faj képes lebontani azokat a toxikus metabolitokat, melyek a másik faj működését akadályozzák
- A konzorcium tagjai képesek lehetnek egymás enzimrendszerét kiegészíteni (az egyik faj degradációs végtermékének további hasznosítása másik faj által) (Mukred 2008).

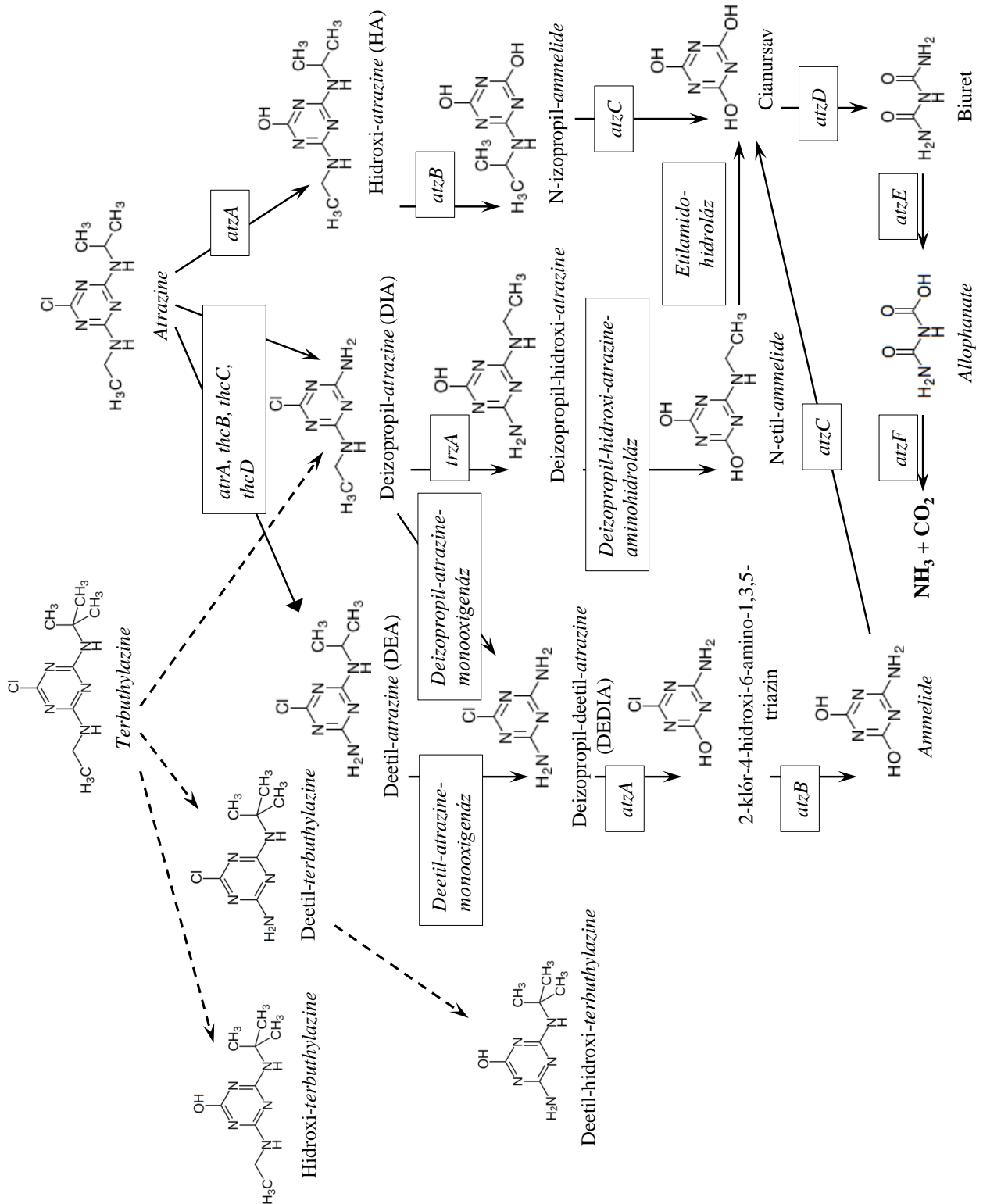
Az elmúlt negyven évben rengeteg kísérlet zajlott és kutatási eredmény született az s-triazinok, főként az *atrazine* biológiai lebontásának vizsgálatára kapcsán. Az eredmények azt mutatják, hogy a s-triazin vegyületek biodegradációjának során a legfőbb szerepet a klór-, amino- és alkilamino-csoportok s-triazin gyűrűről történő hidrolitikus lehasítása (Cook, 1987) és/vagy az oldalláncok oxidatív dealkilációja (Erickson&Lee 1989) játssza. Számos kutatás eredménye abba az irányba mutatott, miszerint a s-triazin vegyületek lebomlásuk során cianursavvá redukálódnak, ami majd hidrolitikus gyűrűhasító reakciók során CO<sub>2</sub>-dá és NH<sub>3</sub>-vá, valamint biuretté bomlanak. A cianursav további lépésekben történő bomlásának molekuláris és biokémiai alapjait Eaton és Karns (1991a, 1991b) munkássága tisztázta. Az 1990-es évek óta óriási mennyiségű új információt nyertünk az s-triazinok biodegradációjának útvonalairól és enzimatiszteréről. Az *atrazine* és *terbuthylazine* eddigi kutatások eredményei alapján szakirodalomban fellelhető lehetséges lebomlási útvonalait, valamint a résztvevő enzimeket, illetve azokat kódoló eddig megismert géneket a 3. ábra mutatja be.

Napjainkig a *Pseudomonas sp.* ADP az egyetlen törzs, melyről igazolták, hogy NH<sub>3</sub>-ig és CO<sub>2</sub>-ig képes mineralizálni az *atrazine*-t. 2001-ben készült el a törzsből izolált *pADP-1* plazmid teljes szekvencia analízise (Martinez 2001), melyben megtalálható az az elsőként leírt géncsalád (*atzABCDEF*), mely szükséges az *atrazine* mineralizációjához (Mandelbaum et al. 1995). Ezen a géncsaládon kívül az elsőként a *Pseudomonas sp.* NRRLB-12228 törzsből izolált *trzD* gén az s-triazin gyűrű hasításában játszik szerepet (Ostrofsky et al. 2002), a *Nocardioideis sp.* SP12 törzs *trzN* génje pedig egy klorohidroláz enzimet kódol (Piutti et al. 2003). Az *atrA*, *thcA*, *thcB* és *thcD* gének, a citokróm P450 család tagjai, olyan moxigenzákat kódolnak, melyek dealkilációs aktivitással rendelkezve az *atrazine* degradációjában szintén közreműködnek (Shao&Bekhi 1996).

Az elmúlt évtizedek kutatásai során számos baktériumnemzetségről és fajról írták le, hogy tiszta tenyészetben képesek az *atrazine* lebontására. Többek között ilyen az *Acinetobacter junii* (Feakin et al. 1995), *Agrobacterium radiobacter* (Struthers et al. 1998), *Arthrobacter spp.* (Aislabie et al. 2005, Cai et al. 2003, Getenga et al. 2009, Vaishampayan et al. 2007), *Bacillus sp.* (Korpraditskul et al. 1993), *Chelatobacter heintzii*, *Aminobacter aminovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Arthrobacter crystallopoietes* (Rousseaux et al. 2001, 2003), *Rhodococcus corallinus* (Cook&Hütter 1984, 1986), *Rhodococcus rhodochrous* (Feakin et al. 1995), *Rhodococcus sp.* TE1 és B-30 (Behki et al. 1993, Behki&Khan 1994), *Pseudomonas spp.* (Mandelbaum et al. 1995, Yanze-Kontchou&Gscwind 1994), *Pseudoaminobacter sp.* (Topp et al. 2000), *Ralstonia basilensis* (Stamper et al. 2002), *Streptomyces sp.* (Shelton et al. 1996).

A *terbuthylazine* biodegradációjáról lényegesen kevesebb adatot lehet fellelni. A szakirodalom szerint néhány gomba és baktérium, többek között az *Aspergillus oryzae*, *Penicillium brevicompactum* (Pinto et al. 2012), *Letinula edodes* (Pinto et al. 2011), *Hypholoma fasciculare* és *Stereum hirsutum* (Bending et al. 2002) gombafajok, egy *Arthrobacter* faj (Getenga et al. 2009), *Advenella incenata* és *Janthinobacterium lividum* (Barra Caracciolo et al. 2010), *Arthrobacter aurescens* TC1 (Silva et al. 2015) és *Rhodococcus wratislawiensis* (Grenni et al. 2009) baktériumok voltak képesek a vegyület bontására.

Mikrobiális konzorciumokról már lényegesen kevesebb kutatás készült (Mandelbaum et al. 1993, de Souza et al. 1998, Smith et al. 2005, Zhang et al. 2011a, 2012a) és noha sok esetben számoltak be az *atrazine* nagymértékű lebontásáról akár tiszta tenyészetekkel akár keverékekkel, a degradáció során keletkező termékek és végtermékek együttes biológiai hatásai nem, vagy nagyon szegényesen vizsgáltak.



3. ábra - Az atrazine és terbuthylazine lehetséges biológiai lebomlási útvonalai, a degradációban szereplő játszó gének és enzimek (saját készítésű ábra).



## 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A munka egészének könnyebb áttekintését segítő a doktori kutatásom során megfogalmazott célokat és az azok eléréséhez alkalmazott módszereket sematikusan az M2 melléklet folyamatábrája mutatja be. A kutatás során, ill. az M2 mellékletben is feltüntetett módszerek és alkalmazott anyagok részletes leírását a következő alfejezetek tartalmazzák.

### 4.1 Biodegradációs kísérlet

#### 4.1.1 Alkalmazott baktériumtörzsek és konzorciumok

Munkám során összesen 43, korábbi vizsgálati eredményeink szerint gyűrűs és nyílt szénláncú szénhidrogéneket degradálni képes baktériumtörzs és 21, belőlük alkotott konzorcium *atrazine* biodegradációs képességét vizsgáltam. Az *atrazine* lebonthatóságának eredményei alapján az egyedi törzsek közül 6, a konzorciumok közül 3 esetben állítottam össze kísérletet a *terbuthylazine* biodegradálhatóságának megismerésére. A *terbuthylazine* bontásába vont törzseket a későbbiekben bemutatott, *atrazine*-ra vonatkozó eredmények alapján választottam ki. A törzsek listáját, azok faj szintű besorolását és a törzsek eredetét az 2. táblázat mutatja, a belőlük alkotott konzorciumok a 3. táblázatban találhatóak. A 43 baktériumtörzs összesen 15 különböző nemzetséget, valamint 27 fajt képviselt. A törzsek többsége – 24 – hazai, szénhidrogénekkal szennyezett környezeti elemekből lett izolálva, 13 törzs komposztmintákból, 5 törzs természetvédelmi területek talajaiból származik. 1 törzs, a *Pseudomonas sp.* ADP törzs nemzetközi törzsgyűjteményben található meg letétbe helyezve *Pseudomonas citronellolis* fajként, mely nemzetközi szakirodalomban publikált eredmények alapján kiváló *atrazine*-bontó képességgel rendelkezik (Mandelbaum et al. 1995), melyet referencia-törzsként kívántam használni. Noha a *Pseudomonas sp.* ADP törzs szakirodalmi adatok alapján képes az *atrazine* teljes mineralizációjára, illetve rendelkezik azzal a géncsaláddal, mely az ehhez szükséges enzimeket kódolja, vizsgálataimban az 50 mg/L koncentrációjú *atrazine*-nak mindössze 22%-át volt képes 7 napos szubmerz tenyészetben történő rázatás során degradálni. Tehát a mineralizációhoz szükséges gének megléte még nem feltétlenül jelenti, hogy a törzs minden körülmény között képes a vegyület degradációjára. Ahogyan azt az Irodalmi áttekintés 3.4.4. fejezetében bemutattam, a *Pseudomonas sp.* ADP törzsben leírt *atz* géncsaládon kívül további génekről (ill. termékeikről) is bebizonyosodott már, hogy részt vesznek az *atrazine* lebontásában, azonban ez sem feltétlenül jelenti azt, hogy más, eddig ismeretlen enzimek is szerepet játszhatnak a biodegradációban. Ezen okok miatt a konzorciumok megalkotásánál nem az egyedi törzsek irodalomból megismert *atrazine* bontó génjeit kerestem és azok megléte alapján

válogattam össze a konzorciális tagokat, hanem a törzsek biodegradációs képességét figyelembe véve használtam azokat, melyek egyénileg 50%-nál nagyobb mértékben voltak képesek az *atrazine*-t bontani.

**2. táblázat – Atrazine és terbuthylazine biodegradációjának vizsgálatára alkalmazott baktériumtörzsek, azok faj szintű meghatározása, valamint a törzsek eredete. CH – szénhidrogénekkal szennyezett területről származó talaj/talajvíz; K – komposzt; TV – természetvédelmi terület talaja; DSMZ – Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH**

NEMZETSÉG	FAJ	TÖRZS JELE	TÖRZS EREDETE	VIZSGÁLT PESTICID
<i>Acinetobacter</i>	<i>venetianus</i>	T3N9	CH	<i>atrazine</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>protophormiae</i>	J4	K	<i>atrazine</i>
<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	NZS19	K	<i>atrazine</i>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>formosense</i>	UA5/8	CH	<i>atrazine</i>
	<i>hungaricum</i>	CHB20p	CH	<i>atrazine</i>
	<i>rhizosphaerae</i>	TN4	CH	<i>atrazine</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>basilensis</i>	BRB6A	TV	<i>atrazine</i>
		OR16	TV	<i>atrazine</i>
		T3SZ4	CH	<i>atrazine</i>
<i>Gordonia</i>	<i>paraffinivorans</i>	NZS14	K	<i>atrazine</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>barkeri</i>	EL1	K	<i>atrazine</i>
	<i>esteraromaticum</i>	NZS9	K	<i>atrazine</i>
<i>Ochrobactrum</i>	<i>tritici</i>	DT2	CH	<i>atrazine</i>
<i>Olivibacter</i>	<i>oleidegradans</i>	TBF2/20.2	CH	<i>atrazine</i>
<i>Paracoccus</i>	<i>kondratievae</i>	BSZ10	K	<i>atrazine</i>
		CSZ4	K	<i>atrazine</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>citronellolis</i>	ZS1	K	<i>atrazine</i>
		DSM 11735	DSMZ, Mandelbaum et al., 1995	<i>atrazine</i>
	<i>pseudoalcaligenes</i>	FEH28	K	<i>atrazine</i>
	<i>putida</i>	NCP3	CH	<i>atrazine</i>
	<i>stutzeri</i>	KO5	K	<i>atrazine</i>
<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>kalamensis</i>	H4	K	<i>atrazine</i>
	<i>suwonensis</i>	NZS6	K	<i>atrazine</i>
<i>Rhodococcus</i>	<i>aetherivorans</i>	AK44	CH	<i>atrazine</i>
	<i>erythropolis</i>	AK35	CH	<i>atrazine</i>
		NI1	CH	<i>atrazine</i>
		BRB1AB	TV	<i>atrazine</i>
		GD2A	TV	<i>atrazine, terbuthylazine</i>
	<i>globerulus</i>	AK36	CH	<i>atrazine</i>
	<i>pyridinivorans</i>	AK37	CH	<i>atrazine</i>
		AK38	CH	<i>atrazine</i>
		CHB15p	CH	<i>atrazine</i>
		K402	CH	<i>atrazine, terbuthylazine</i>
		K404	CH	<i>atrazine, terbuthylazine</i>
		K408	CH	<i>atrazine</i>
	<i>qingshengii</i>	BA4.9	CH	<i>atrazine</i>
		EB22/5	CH	<i>atrazine</i>
PT2/14B		CH	<i>atrazine, terbuthylazine</i>	
<i>rhodochrous</i>	AK40	CH	<i>atrazine</i>	
	CW25	CH	<i>atrazine, terbuthylazine</i>	
<i>Serratia</i>	<i>fonticola</i>	PT1/1	CH	<i>atrazine</i>
<i>Sphingopyxis</i>	<i>chilensis</i>	KO10	K	<i>atrazine</i>

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai ubikviter baktériumok. Több törzsről írták már le, hogy különböző xenobiotikumok biodegradációjára képesek, úgymint bifenilek és klórozott bifenilek, aminosavak, fenol, benzol, nyersolaj, acetonitril, valamint közrejátszanak foszfát és nehézfémek szennyezett közegekből történő kivonásában. A biotechnológiában is egyre inkább figyelmet kapnak számos extra- és intracelluláris enzimük, pl. lipázok, proteázok, cianoficin, bioemulzifikálószerke és különböző biopolimereket termelő képességük miatt (Abdel-El-Halem 2003, Towner, 2006).

Az *Arthrobacter* nemzetség tagjai többségében vízi környezetből lettek izolálva, jelentőségüket szénhidrogénekkal szennyezett területen igazolták. Nehezen bontható xenobiotikumok degradálására képesek, többek között pl. különböző szénhidrogének (Efroymson et al. 1991), nitrobenzolok (Pandey et al. 2003, Wang et al. 2015), nitrofenol (Jain et al. 1994), piridin-származékok (O'Loughlin et al. 1991), benzo[a]pirén (Peng et al. 2012), *diuron* herbicid (Turnbull et al. 2011), *atrazine* herbicid (Stron et al. 2002, Xie et al. 2013).

A *Bacillus* nemzetség biodegradációs képességével foglalkozó legtöbb szakirodalom főként jó szénhidrogén-, ill. nyersolaj-bontó képességükről számol be (Darsa et al. 2014, Das&Mukherjee 2007, Mulani et al. 2017, Thamer et al. 2013 ), de található peszticideket, mint pl. *malathion*-t (Ratna Kumari et al. 2012), *dichlorvos*-t (Pavar&Mali, 2014), *chlorpyrifos*-t (Chandrashekar et al. 2017), *carbofuran*-t (Nisha et al. 2016), illetve *glyphosate*-ot (Yu et al. 2015) is degradálni képes *Bacillus* törzsek a szakirodalomban.

A *Chryseobacterium* nemzetség egyik tagjának, egy faj szinten azonosítatlan izolátumnak a metil-terc-butyl-éter bontó képességéről jelentettek meg tanulmányt (Zhang et al. 2007). Jelenlétüket kimutatták már felszíni- és felszín alatti vizekben, ivóvízben, talajban, élelmiszerekben (hús, tej, hal), valamint klinikai mintákban egyaránt (Vandamme et al. 1994, Gallego et al. 2006, Hugo et al. 2003, Kämpfer et al. 2003, Li et al. 2003).

A *Cupriavidus* nemzetség több tagján detektáltak már aromás és klóros aromás vegyületek degradálásának képességét, mint pl. a műanyaglágyítóként használatos, endokrin diszruptor biszfenol A-t (Fischera et al. 2010), 2-klór-4-nitrofenolt (Tiwari et al. 2017), indolt (Qu et al. 2015), a fungicidként használatos pentaklór-nitrobenzolt (Teng et al. 2017), a herbicid 2,4-D-t (Wu et al. 2017). Az általam vizsgált OR 16 *Cupriavidus basilensis* törzs korábbi kutatási eredmények szerint az Ochratoxin A mikotoxin degradációjára volt képes (Ferenczi et al. 2014).

A *Gordonia* nemzetség legtöbb tagja a szakirodalmi adatok alapján képes környezeti szennyezőanyagok, xenobiotikumok metabolizálására, illetve aromás szénhidrogének bontásában vett részt (Shen et al. 2006).

A *Microbacterium* nemzetség tagjai is számos aromás, poliaromás vegyület, pl. fenol (Abdel-Razek et al. 2015), antracén (Salam et al. 2014), pirén (Salam et al. 2017), benzo[a]pirén (Qin et al. 2017), szulfonamid antibiotikumok (Ricken et al. 2015, Tappe et al. 2013), fotoszintézisgátló brómoxinil (Pasquarelli et al. 2015) lebontására képesek, de az *atrazine* és *terbuthylazine*-hoz szerkezetileg nagyon hasonló, szintén szimmetrikus triazin-vegyület, a melamin, valamint ezen vegyületek egyik lehetséges bomlásterméke, a cianursav degradációjára képes *Microbacterium* törzsről is beszámol a szakirodalom (Shiomi&Ako 2012).

Az *Ochrobactrum* nemzetség több tagja kapcsán aromás (Kılıç 2009), különböző poliaromás (Arulazhagan&Vasudevan 2011) és halogénezett szénhidrogének bontását kimutatták (Yamada et al. 2008), de egyes törzsek képesek a *quinalphos* organofoszfát peszticid (Talwar et al. 2014) és bomlásterméke (Subba et al. 2016), továbbá a neonikotinoid *acetamiprid* (Wang et al. 2013a) biodegradációjára is.

Az *Olivibacter* nemzetség összesen 5 fajt számlál, a vizsgálataimba bevont *Olivibacter oleidegradans* a Szent István Egyetem Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszéke által 2011-ben leírt faj, melynek kapcsán először sikerült igazolni a genuszon belül szénhidrogén bontó képességet (Szabó et al. 2011).

A *Paracoccus* tagjai denitrifikáló baktériumok (Madigan et al. 2003), de számos xenobiotikum lebontására is képesek, úgymint a főként oldószerként használatos N-metil-2-pirrolidon (Cai et al. 2014), piridin (Lin et al. 2010), dimetil-formamid (Nisha et al. 2015), valamint számos peszticid, köztük a rovarölő *fipronil* (Kumar et al. 2012), *carbofuran* (Peng et al. 2008), valamint különböző klóracetamid herbicidek (Zhang et al. 2011b).

A *Pseudomonas* nemzetség tagjai nagyon sokféle xenobiotikumot, szervesanyagot, képesek hasznosítani, úgymint klórozott alifás szénhidrogének, BTEX vegyületek, poliklórozott aromás szénhidrogének, organoklór-, organofoszfát- és karbamát inszekticidek (Khalon 2016), valamint az első, *atrazine*-t teljes mértékben mineralizálni képes mikroba, a *Pseudomonas sp.* ADP is ebbe a nemzetségbe tartozó törzs (Mandelbaum et al. 1995), melynek biodegradációs képességét én is vizsgáltam munkám során.

A *Pseudoxanthomonas* fajok egyes törzseiről szintén különböző xenobiotikum-degradációs képességét írták le, úgymint *profenofos* (organofoszfát inszekticid) (Talwar&Ninnekar 2015), *isoproturon* (fotoszintézisgátló herbicid) (Giri et al. 2016), *acetamiprid* (Wang et al. 2013b), DDT (Wang et al. 2011), dinitrotoulol (Cheng 2007), di(etilhexil)ftalát (Meng et al. 2015) és különböző BTEX vegyületek is (Choi et al. 2013).

A *Rhodococcus genus* tagjai ubikviter baktériumok, melyek bolygatatlan, valamint szennyezett környezeti elemekben, akár rendkívül kedvezőtlen viszonyok között egyaránt



megtalálhatók. A *genus* az egyik legígéretesebb mikrobacsoport olyan szennyezőanyagok biodegradációjához, melyeket egyéb organizmusok nehezen, vagy nem képesek metabolizálni. A *Rhodococcus*ok biokémiai potenciálja rendkívüli katabolikus aktivitásuknak, illetve unikális enzimeiknek köszönhető, mely a baktériumok között egyedülállóan nagy (akár 9.7 Mbp) genomjukkal is összefüggésben áll. A *Rhodococcus*ok által metabolizált xenobiotikumok szerkezetileg nagyon széleskörű csoportokat fednek le, többek között alifás, aromás és poliaromás szénhidrogéneket, oxidált és halogénezett vegyületeket, aromás nitrovegyületeket, heterociklusos anyagokat, nitrileket, valamint számos növényvédőszer (Kuyukina&Ivshina 2010), többek között az *atrazine*-t is (Mandelbaum et al. 2008).

A *Serratia* nemzetségen belül leginkább a *Serratia marcescens* fakultatív patogén faj törzseinek degradációs képességét vizsgálták, mely képes bontani különböző peszticideket, mint pl. *DDT* (Neerja et al. 2016), szulfonurea herbicidek (Zhang et al. 2012b), *diazinon* (Abo-Amer 2011), *malathion* (Nadalian et al. 2016), de számos más növényvédő szer, ill. polietilén (Azeko et al. 2016) bontásáról is beszámoltak már.

A *Sphingopyxis* nemzetség tagjai poli-béta-hidroxi-butirát (PHB) raktározásra képesek (Silva et al. 2007), valamint olyan törzsekről is beszámol a szakirodalom, mely 5 mikrocisztin (cianotoxin) variánst (Maghsoudi et al. 2016) és PAH vegyületeket tud bontani (Shokrollahzadeh et al. 2015).

A vizsgálataimba bevont törzsek nemzetségeinek biodegradációs képességét röviden bemutató fenti bekezdések alapján tehát látható, hogy sok, változatos szerkezeti elemeket tartalmazó xenobiotikumok lebontására lehetnek képesek, illetve feltételezhetően akár az *atrazine* és *terbuthylazine* degradációjára is alkalmasak lehetnek az ezekben a *genus*-okba tartozó törzseim.

A törzsek faji identifikációja részleges, illetve amennyiben ez nem volt elegendő, teljes 16S rRNS szekvencia analízis alapján történt. A szekvenciákat az EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) nemzetközi adatbázisban található, valid fajok 16S rRNS szekvenciáival összevetve határoztuk meg a törzsek faji hovatartozását. 98%-os szekvencia egyezés esetén tekintettük az adatbázisban található fajhoz tartozónak a törzseinket.

A törzsek tárolása jelenleg is -80 °C-on történik.

#### **4.1.2 Bontási kísérletek összeállítása**

A vizsgálandó törzsekből elsőként inokulumot hoztam létre. Ehhez a törzseket LB agarlemezekre (tripton 10 g, élesztőkivonat 5 g, NaCl 9 g, bakteriológiai agar 18 g, desztillált víz 1000 mL) szélesztettem. 28 °C-on történő 72-96 órás inkubáció után a törzsek 1-1 telepét 50 mL LB tápoldatba oltottam és 72 órán át 170 rpm fordulaton rázattam 28 °C-on kör-sík rázógépen

(Certomat® BS-1, Sartorius Stedim Biotech). Az inokulumok optikai denzitását 600 nm-es hullámhosszú fény abszorbanáciája alapján spektrofotométerrel (Genesys™ 10S UV-Vis, ThermoFisher Scientific) egységesen 0,6-os értékre állítottam be LB tápoldattal. Az OD<sub>600</sub>=0,6 értékű inokulumokból 5-5 mL-t mértem 45 mL steril LB tápoldatba, melyet előzőleg *atrazine*-nal (Pestanal®; CAS 1912-24-9, tisztaság 98.6%, Sigma-Aldrich Ltd., jelenleg Merck), illetve *terbuthylazine*-nal (Pestanal®; CAS 5915-41-3, tisztaság 99,4 %, Sigma-Aldrich Ltd.) kontamináltam. A peszticidekből 25 mg/mL koncentrációjú törzsoldatot készítettem dimetil-szulfoxidban (DMSO; CAS 67-68-5, tisztaság ≥99.9%, Fisher Scientific), majd 100-100 µL-t mértem be az inokulált tápoldatokba 50 mg/L-es végkoncentráció eléréséhez. A lombikokat ezután 28 °C-on rázattam 7 napon keresztül 170 rpm fordulatszámom. Az egyénileg több, mint 50%-os biodegradációs képességet mutató törzsekből alkotott konzorciumok a 3. táblázatban láthatók.

**3. táblázat – Atrazine biodegradációs kísérletben 50%-nál jobb bontási képességet mutató törzsekből alkotott konzorciumok törzs-összetétele és faji besorolása, valamint a konzorciumok általi biodegradációs kísérletben használt peszticidek.**

KONZORCIUMOKAT ALKOTÓ TÖRZSEK JELE	KONZORCIUMTAGOK FAJI BESOROLÁSA	BIODEGRADÁCIÓRA VIZSGÁLT PESZTICID
AK37 + NI1	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. erythropolis</i>	<i>atrazine</i>
AK37 + OR16	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>C. basilensis</i>	<i>atrazine</i>
AK37 + OR16 + NI1	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>C. basilensis</i> + <i>R. erythropolis</i>	<i>atrazine</i>
AK44 + NI1	<i>R. aetherivorans</i> + <i>R. erythropolis</i>	<i>atrazine</i>
AK44 + T3SZ4	<i>R. aetherivorans</i> + <i>C. basilensis</i>	<i>atrazine</i>
AK44 + CHB15p	<i>R. aetherivorans</i> + <i>R. pyridinivorans</i>	<i>atrazine, terbuthylazine</i>
AK44 + CHB15p + TBF2/20.2	<i>R. aetherivorans</i> + <i>R. pyridinivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine, terbuthylazine</i>
AK44 + NI1 + TBF2/20.2	<i>R. aetherivorans</i> + <i>R. erythropolis</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>
AK44 + TBF2/20.2	<i>R. aetherivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>
CHB15p + T3SZ4	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>C. basilensis</i>	<i>atrazine</i>
CHB15p + NI1	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. erythropolis</i>	<i>atrazine</i>
CHB15p + TBF2/20.2.	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>
K404 + OR16	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>C. basilensis</i>	<i>atrazine</i>
K404 + TBF2/20.2	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>
K404 + PT2/14B	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. qingshengii</i>	<i>atrazine</i>
NI1 + OR16	<i>R. erythropolis</i> + <i>C. basilensis</i>	<i>atrazine</i>
NI1 + T3SZ4	<i>R. erythropolis</i> + <i>C. basilensis</i>	<i>atrazine</i>
NI1+ TBF2/20.2	<i>R. erythropolis</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>
OR16 + PT2/14B	<i>C. basilensis</i> + <i>R. qingshengii</i>	<i>atrazine</i>
PT2/14B + TBF2/20.2	<i>R. qingshengii</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>
T3SZ4 + TBF2/20.2	<i>C. basilensis</i> + <i>O. oleidegradans</i>	<i>atrazine</i>

A konzorciumok esetében a bontási rendszerek összeállítása és inkubálása ugyanígy történt azzal a különbséggel, hogy az egyes inokulumokat optikai denzitás érték beállítása utána 1:1 arányban kevertem, majd a keverékből mértem 5-5 mL-t 45 mL kontaminált tápoldatba.

A 7 napos rázatás végén a tápoldatokból 10-10 mL-t 15 mL-es centrifugacsőbe mértem és 4000 rpm-en 4 °C-on-on 35 percig cetrifugáltam (Eppendorf 5810R). A felülúszót a pelletről elválasztottam és 0,2 µm-es cellulóz-acetát fecskendőszűrőn átszűrtem (VWR Europe), majd további felhasználásig mind a szűrletet, mind a pelletet -20 °C-on tártoltam. A maradék tápoldatokat eredeti tárolóedénnyel együtt a Wessling Hungary Kft. analitikai laborba szállítottam a maradék *atrazine* és *terbuthylazine* meghatározására, melyet GC-MS módszerrel végeztek. A bontási vizsgálatokat először 1 beállításban végeztem el, majd azokkal a törzsekkel, ahol az első mérés több, mint 50%-os degradációt mutatott, még két kísérletben megismételtem, ezen mérések átlagát és szórását tüntettem fel az eredmények bemutatásánál.

## 4.2 Citotoxicitás mérés *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia-gátlási teszttel

Annak meghatározása érdekében, hogy a meghosszabbított kontaktidejű *Aliivibrio fischeri* teszt megfelelően érzékeny-e az *atrazine* és *terbuthylazine* peszticidek citotoxicitásának mérésére, elvégeztem a tiszta hatóanyagokkal az akut, 30 perces standardizált tesztet, valamint a krónikus, 25 órás kontaktidejű *A. fischeri* tesztet, majd az EC<sub>50</sub> értékeket összevettem egymással, illetve a szakirodalomban fellelhető értékekkel. Miután meggyőződtem a megfelelő érzékenységről, a bontási maradékanyagok citotoxicitásának mérését a krónikus *A. fischeri* teszttel végeztem el.

### 4.2.1 Akut Microtox® teszt

Az *atrazine* és *terbuthylazine* akut citotoxikus hatásának mérésére a 30 perces Microtox® tesztet alkalmaztam Microtox® Model 500 Toxicity Analyzer System (Azur Environmental, Carlsbad, CA) segítségével. Tesztszervezetként a Gram-negatív, pálcika alakú, fakultatív aerob biolumineszcens tengeri baktériumot, az *A. fischeri*-t használtam (DSM 7151, NRRL B-11177). Az *A. fischeri* baktériumban a *luxCDABEG* gének felelősek a biolumineszcenciáért, amit a luciferáz enzim katalizál molekuláris oxigén, hosszú szénláncú alifás aldehidek, valamint redukált flavin-mononukleotidok (FMNH<sub>2</sub>), mint szubsztrátok felhasználása során (Miyashiro&Ruby 2012). A metabolikus energia konvertálás látható fény kibocsátásával jár, amennyiben tehát a normális metabolikus aktivitás sérül a baktériumban, a fénykibocsátás csökken. A peszticidek toxicitásának meghatározása tehát a lumineszcencia gátlása révén mérhető, melyet az ISO 11348-1 (1998) szabvány alapján végeztem el. A mérésekhez 25 mg/mL koncentrációjú *atrazine* és *terbuthylazine* törzsoldatokat használtam, melyekből 4 v/v% DMSO-t tartalmazó 2 m/m%-os NaCl oldattal készítettem el *atrazine* esetében 125 µg/mL-től 9,375 µg/mL-ig, *terbuthylazine* esetében 100 µg/mL-től 6,25 µg/mL-ig terjedő koncentrációtartományban a 9 tagú hígítási sorokat. Az akut tesztben a DMSO

végkoncentrációja minden hígítási tag, valamint a kontroll esetében is 2 v/v% volt. A vegyületeknek azt a hatásos koncentrációját, mely 50%-kal képes csökkenteni a tesztszervezet fénykibocsátását ( $EC_{50}$ ) 30 perces kontaktidő után határoztam meg a Microtox® program által.

#### 4.2.2 *Krónikus A. fischeri* teszt

Az *atrazine* és *terbuthylazine*, valamint a bontási kísérletekből származó maradékanyagok hosszú távú citototoxikus hatását 96-lyukú, fekete, lapos aljú PS mikrotiter lemezeken (Greiner-Bio-One GmbH, Ausztria) végeztem el 200  $\mu$ L végtérfogatban. A lemezeket a kísérleti rendszerek összeállítása után minden esetben 25 °C-on inkubáltam 250 rpm rázatás mellett mikroplate rázó termosztátban (PST-60HL-4, BioSan, Litvánia). A biolumineszcencia értékeket (fotonbecsapódás/másodperc, CPS) Victor™ X Light 2030 Luminescence Reader (Perkin Elmer, USA) segítségével mértem 3,5, 10, 15 és 25 órás kontaktidő után. A kísérleteket minden esetben 3 ismétlésben, ismétlésenként 3 párhuzamos mérésben végeztem.

##### 4.2.2.1 *Tiszta hatóanyagok vizsgálata*

Az *A. fischeri* (DSM 1751, NRRL B-11177) tesztszervezetet ferde Bacto Marine agarra (Difco 2216 18 g/L bakteriológiai agarral kiegészítve) oltottam. 24 órás 20 °C-on történő inkubáció után a baktérium biomasszát Bacto Marine Broth (Difco 2216) tápoldatba mostam és a szuszpenzió optikai denzitását ( $OD_{600}$ ) 0,1 értékre állítottam be. A mikrotiter lemez lyukaiba az *atrazine* és *terbuthylazine* törzsoldatokból 10-10  $\mu$ L végtérfogatot mérve hígítási sort készítettem  $2E+02$   $\mu$ g/mL-től  $9,77E-02$   $\mu$ g/mL-ig, illetve 100  $\mu$ g/mL-től  $4,9E-02$   $\mu$ g/mL-ig 1:2 arányú hígításban. A hígító folyadék, illetve a negatív kontroll DMSO volt. Kizárólag *A. fischeri* tenyészetet is alkalmaztam kontrollként. A végtérfogatot 200  $\mu$ L-re állítottam be *A. fischeri* szuszpenzióval.

##### 4.2.2.2 *Biodegradációs maradékanyagok vizsgálata*

Az előzőleg bemutatott módon 24 órás friss *A. fischeri* tenyészetből készített szuszpenzió optikai denzitását ( $OD_{600}$ ) ez esetben 0,2 értékre állítottam. Az előzőleg 0,2  $\mu$ m-es szűrőn (cellulóz-acetát, VWR Europe) átszűrt bontási maradékanyagokból 100-100  $\mu$ L-t mértem az egyes lyukakba. A tesztszervezet számára megfelelő sókoncentráció fenntartásának érdekében minden mintához 10  $\mu$ L tömény (10x) Bacto Marine oldatot mértem. Tekintettel arra, hogy a baktériumok képesek olyan anyagokat termelni, melyek önmagukban citotoxikus hatásúak lehetnek, a törzsekből, ill. konzorciumokból a bontási kísérlet során alkalmazott módon inokulumot készítettem, ezt 7 napig peszticid hozzáadása nélkül inkubáltam. Ezen inokulumok 0,2  $\mu$ m-es szűrőn (cellulóz-acetát VWR Europe) átszűrt felülúszóját alkalmaztam a

maradékanyagok negatív kontrolljaként. A végtérfogatot ebben az esetben is 200  $\mu\text{L}$ -re egészítettem ki az *A. fischeri* szuszpenzióval.

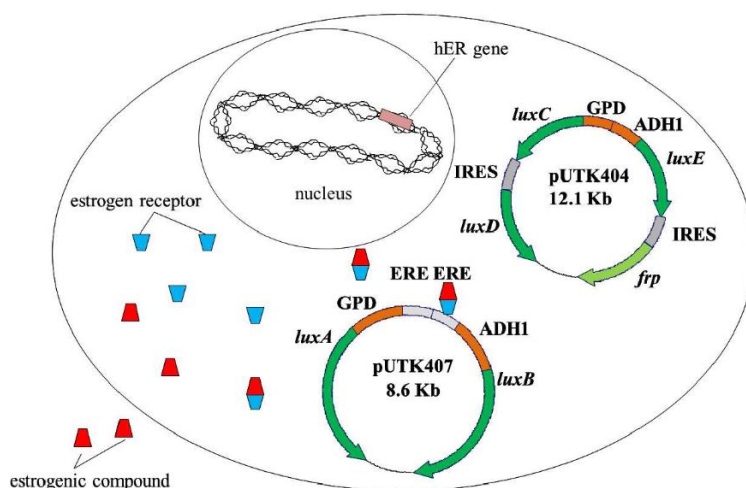
### 4.3 Kombinált módszer kifejlesztése és alkalmazása közvetett endokrin diszruptor hatás mérésére

Az *atrazine* közvetett endokrin diszruptor hatásának vizsgálatához egy humán H295R embrionális adrenokortikális (mellékvesekéreg) karcinóma sejtvonalat, valamint a Tennessee University munkatársai által létrehozott és jóvoltából a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék számára tudományos vizsgálatok céljára rendelkezésre bocsátott *Saccharomyces cerevisiae* alapú bioripporter teszteket használtam.

A humán H295R sejtvonala a szteroidogenezis szinte összes kulcsfontosságú enzimével rendelkezik (Gazdar et al. 1990, Rainey et al. 1994), ezáltal a sejtvonala kiváló *in vitro* modell a szteroidszintézis útvonalainak és folyamatainak vizsgálatára (Hecker&Giesy 2008, US EPA 2011).

Sanseverino és mtsai (2005), valamint Eldridge és mtsai (2007) olyan költséghatékony és gyors biotesztet fejlesztettek ki, mely segítségével kemikáliák potenciális ösztrogén és androgén hatása mérhető. A *Saccharomyces cerevisiae* törzsek BLYES és BLYAS konstrukcióit úgy alkották meg, hogy azok kromoszómájába humán ösztrogén és androgén receptorokat kódoló géneket integráltak, továbbá a sejtbe olyan plazmidokat, melyek ösztrogén és androgén válaszfeleleket, ill. a prokarióta *Photobacterium luminescens lux*-génjeit hordozzák. Így tehát amennyiben olyan anyaggal exponáljuk a *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS sejteket, melyek képesek közvetlenül humán ösztrogén- vagy androgén-receptorhoz, majd komplexként a válaszfelelekhez kötődni, aktiválódnak a *lux*-gének, biolumineszcenciát eredményezve (A BLYES konstrukciót sematikusán a 4. ábra mutatja be). A biolumineszcens bioripporter tehát alkalmasak ösztrogén és androgén hatás mérésére. A BLYR konstrukcióban a *lux*-gén konstutíván fejeződik ki, ez a törzs citotoxikus hatás mérésére alkalmas: amennyiben a sejtek toxikus anyaggal érintkeznek, csökken a fénykibocsátás.

Célom az volt, hogy a két módszer összekapcsolásával vizsgálni tudjam az *atrazine* indirekt hormonháztartást zavaró hatását, hipotézisem az volt, hogy ha a humán sejtekben lejátszódó szteroidszintézis zavart szenved, a megváltozott mennyiségben termelődő nemi hormonokat az ösztrogén és androgén hatást mérő BLYES és BLYAS bioripporter tesztekkel ki lehet mutatni.



4. ábra – A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzs sematikus ábrája. Ösztrogénhatású anyag sejtmembránon történő áthaladása után a humán ösztrogén receptoroz (hER) kötődik. Az így keletkezett komplex a kapcsolódik az ösztrogén válaszelemhez (ERE), mely a luxA és luxB gének átíródását indítja el. A BLYAS törzs genomjába humán androgén receptort kódoló gén van integrálva, melyről humán androgén receptor fejeződik ki, illetve androgén válaszelemet tartalmaz a plazmid (Eldridge et al., 2011).

#### 4.3.1 H295R sejtvonal és tenyésztési körülmények

A H295R adrenokortikális karcinóma sejtvonalat (NCI-H295R, no. 300483) a CLS Cell Line Cerivce GmbH-től (Németország) szereztük be. A sejtvonal tenyésztését az OCSP 890.1550 Guideline (US EPA 2011) alapján végeztük, melyet röviden a következőkben ismertetek. A fagyasztott sejteket érkezés után DMEM:F12 1:1 arányú keverékét tartalmazó tápoldatban szaporítottuk legalább 5 passzázon keresztül, melyet ITS + Premix-szel (inzulin, transferrin, szelén, BSA és linolsav, 1:100 arányú hígításban; BD) valamint FCS-sel (2,5 v/v% végkoncentrációban) egészítettük ki. A sejtek tárolása folyékony nitrogénben történik. Az 5. és 10. passzázs között a sejteket tripszinezéssel (0,5%) összegyűjtöttük, majd  $2E+05$  sejtet ültettünk 24 lyukú sejtenyésztő lemez mélyedéseibe, melyek 24 óra után 60-70%-os konfluenciát értek el. Ezután a H295R sejteket a tesztanyagokkal exponáltuk, negatív kontrollként a tesztanyagokkal bevitt azonos mennyiségű oldószert (DMSO) használtuk ( $1\mu\text{L}/\text{mL}$  tápoldat). A szteroidogenezis teszthez a sejteket ismert aromataz induktor forskolinnal (CAS 66575-29-9, tisztaság >99%, Sigma-Aldrich), illetve inhibitor hatású *prochloraz*-zal (CAS 67747-09-5, tisztaság 98,6%, Sigma-Aldrich) és *atrazine*-nal kezeltük. A forskolin egy adenili-cikláz aktivátorként is viselkedő vegyület, mely emelkedett cAMP szintet eredményez. Utóbbi egy másodlagos hírvivő molekula, mely létfontosságú szerepet játszik a szteroidszintézis folyamatában a protein kináz A (PKA) szignalizációs útvonal aktiválása révén (Hecker et al. 2006, Seamon et al. 1981), ezáltal egyidejűleg emelkedett ösztrogén és androgén szintet eredményez. A *prochloraz* androgén és ösztrogén receptor antagonistaként viselkedve szteroidogén enzimeket, mint pl. a *CYP17a1* (Vinggaard et al. 2006) és a *CYP19a1* (aromataz) (Andersen et al. 2002) gátol, mely hatására

csökkent a tesztoszteron és az ösztrogénhormonok szintje. A sejtekre 1 mL tápoldat került, melybe első lépésben a pozitív kontroll tesztanyagokat mértük különböző koncentrációtartományokban: a forskolin 0,03, 0,1, 0,3, 1, és 10  $\mu\text{M}$ , a *prochloraz* 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 és 3  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban 1-1  $\mu\text{L}$  DMSO (CAS 67-68-5, tisztaság >99,7%, Sigma-Aldrich)/1 mL médium oldószerrel bejuttatva. 48 órás inkubáció után a sejtekről a felülúszót eltávolítottuk és a felülúszóban található, sejtek által szekretált hormonok hatását BLYES és BLYAS hormonhatásmérő bioripporter teszttel vizsgáltuk.

A továbbiakban *atrazine*-nal 1, 3, 10, 30, 100 és 300  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban exponáltuk a sejteket. Minden tesztben a tesztanyagokkal párhuzamosan ellenőrzésként a pozitív kontroll anyagokkal is kezeltünk sejteket legalább két-két koncentrációban, a Guideline javaslatainak megfelelően. A szteroidogenezis teszt végén (48 óra után) a felülúszókat szintén a BLYES és BLYAS teszttel vizsgáltuk.

A vizsgálatok 3 ismétlésben, ismétlésenként 2 párhuzamos beállításban lettek elvégezve.

#### 4.3.2 **BLYES, BLYAS és BLYR tesztek**

A leucin és uracil szelektív markereket hordozó *S. cerevisiae* BLYES, BLYAS és BLYR konstrukciók (The University of Tennessee, Knoxville) tárolása  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történik. A sejtek szaporítását leucin- és uracil-mentes minimál tápoldatban (YMM, részletes összetétel a M3 mellékletben található) végeztem: 1 mL  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról felolvasztott sejtuszpenziót 30 mL tápoldatba mértem, majd  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 200 rpm fordulaton rázattam (Certomat BS-1, Sartorius Stedim Biotech, Franciaország) egy éjszakán át 1-es optikai denzitás ( $\text{OD}_{600}$ ) eléréséig. A teszteket minden esetben 96-lyukú, fekete, lapos-aljú PS mikrotiter lemezen (Greiner Bio-One GmbH, Ausztria) hajtottam végre. A tesztorganizmumok tesztanyagokkal történő 5 órás exponálása után a biolumineszcencia értékeket (fotonbecsapódás/másodperc, CPS) Victor™ X Light 2030 Luminescence Reader (Perkin-Elmer, USA) segítségével mértem.

A tiszta hatóanyagok (*atrazine*, forskolin és *prochloraz*) és a szteroidogenezis tesztből származó felülúszó minták vizsgálata három ismétlésben, ismétlésenként 3 párhuzamos beállításban történt. Pozitív kontroll vegyületként minden teszt esetében  $17\beta$ -ösztradiolt (E2) és  $5\alpha$ -dihidrotesztozteront (DHT) alkalmaztam  $2\text{E}-05$ -től  $3,5\text{E}-02\text{ }\mu\text{M}$ -ig terjedő koncentrációtartományban 1:2 hígításban  $20\text{ }\mu\text{L}$  metanolban oldva. Negatív kontrollként YMM+élesztő sejt, ill. YMM+élesztő sejt+metanol szolgált.

##### 4.3.2.1 *Keresztreakció tesztelése a BLYES és BLYAS tesztek között*

A BLYES és BLYAS tesztek közötti potenciális keresztreakció felmérése érdekében az E2 BLYAS tesztben, ill. a DHT BLYES tesztben kiváltott hatását mértem.  $20\text{-}20\text{ }\mu\text{L}$  E2-t

( $1,7E+02 - 3,7E+05$   $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban) és DHT-t ( $5,4E+01 - 1,1E+05$   $\mu\text{M}$ ) mértem a titerlemez lyukaiba, majd a metanol elpárolgása után 200  $\mu\text{L}$  BLYAS és BLYES inokulumot az E2-t, ill. a DHT-t tartalmazó mélyedésekbe.

#### 4.3.2.2 *Tiszta tesztanyagok ösztrogén és androgén hatásának mérése*

Annak érdekében, hogy meg tudjam állapítani, hogy a szteroidogenezis tesztben alkalmazott tesztanyagok önmagukban képesek lehetnek-e válaszreakciót kiváltani a BLYES és BLYAS tesztben, ill. van-e citotoxikus hatásuk, a bioripporter teszteket elvégeztem *atrazine*-nal, forskolinnal és *prochloraz*-zal a szteroidogenezis tesztben alkalmazott koncentrációtartományokat használva.

Negatív kontrollként YMM+élesztő, valamint YMM+élesztő+DMSO szolgált.

#### 4.3.2.3 *H295R sejtek által termelt hormonok ösztrogén és androgén hatásának mérése*

Az *atrazine*-nal, forskolinnal és *prochloraz*-zal exponált H295R sejtek 48 órás felülúszójából azok ösztrogén és androgén hatásának, valamint citotoxicitásának megállapítására 20-20  $\mu\text{L}$ -t mértem a titerlemez lyukaiba, majd 180-180  $\mu\text{L}$ -t a már ismertetett módon elkészített BLYES, BLYAS és BLYR tesztstruktúrák szuszpenziójából. A forskolinnal és *prochloraz*-zal kezelt sejtek felülúszója szolgált a tesztben pozitív kontrollként. Negatív kontrollokat alkalmaztam a H295R sejtek alap hormontermelésének mérésére (Médium+H295R), valamint az oldószer (Médium+H295R+DMSO) potenciális hatásának mérésére. Az *atrazine*-nal, forskolinnal és *prochloraz*-zal kezelt H295R sejtek felülúszója által kiváltott biolumineszcencia értékeket az oldószeres kontroll értékeihez hasonlítottam.

#### 4.3.2.4 *Bontási maradékanyagok H295R sejtek hormontermelésére gyakorolt hatásának mérése BLYES és BLYAS teszttel*

Az *atrazine* indirekt endokrin rendszert zavaró hatásának kimutatására kifejlesztett kombinált módszerrel a legjobb bontási hatékonysággal rendelkező és nem citotoxikus végterméket eredményező egyedi baktériumtörzs és két konzorcium maradékanyagának tesztelését végeztem el.

A szteroidogenezis teszt maradékanyagokkal történő elvégzéséhez számos előkísérlet és optimalizálás volt szükséges, tekintettel arra, hogy a humán sejtek érzékenysége igen nagy a tenyésztési körülményeiket illetően. Először a bontási maradékanyagokat kezelés nélkül (csupán 0,2  $\mu\text{m}$ -es pórusátmérőjű szűrés) vittük be a sejtek médiumába, ám ez a humán sejtek gyors pusztulásához vezetett. Mivel a bakteriális metabolitok, felületaktív anyagok, fehérjék stb. szerepet játszhattak ennek a hatásnak a kiváltásában, a továbbiakban a következő módon



kezeltém a maradékanyagokat. A szűrleteket először 2x30 másodpercig szonikáltam 20 kHz frekvencián 20%-os amplitúdóval (Branson Digital Sonifier 102C, Emerson Industrial Automation) annak érdekében, hogy az *atrazine*-ből bakteriális lebontás útján keletkezett vegyületek esetleges fehérjéhez való kötődését roncsoljam. Majd az ultrahanggal kezelt mintákat 3 kDa MWCO (Molecular Weight Cutoff) fehérjeszűrőn (Amicon-Ultra-15, Millipore) szűrtem, mely során minden, 3 kDa-nál nagyobb molekula a bekonzentrált felülúszóban marad, a kisebbek (mint az *atrazine* és bomlástermékei) pedig átjutnak. A bontási kísérletben negatív kontrollként funkcionáló, csak *atrazine*-nal kontaminált tápoldatot, azaz VAK mintát ugyanígy kezeltém. A továbbiakban az így nyert szűrletet vittük be a szteroidogenezis tesztbe, ahol a tesztanyagokból 100 µL mennyiséggel exponáltuk a humán sejteket az 4.3.1 fejeztben leírtaknak megfelelő körülmények között. A krónikus AVF teszthez hasonlóan a bontási maradékanyagok negatív kontrolljaként a baktériumok peszticid nélküli inokuluma szolgált, mely ugyanazokon a kezeléseken esett át, mint a biodegradációs maradékok. A szteroidogenezis teszt után a tesztből származó felülúszók hormonhatásának mérése a 4.3.2. fejezetben leírtak szerint zajlottak.

#### 4.4 Adatok kiértékelése

A biolumineszcencia értékek statisztikai kiértékelését a GraphPad Prism 5 szoftverrel (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) végeztem el. A dolgozatban bemutatott eredmények az adatok átlagaként vannak feltüntetve a standard deviancia (SD) értékekkel együtt. Az egyes kezelések közötti különbségek megállapítására egy-utas ANOVA tesztet használtam Tukey, ill. Dunnett post hoc teszttel,  $p \leq 0,05$  érték esetében tekintettem statisztikailag szignifikánsnak az eltéréseket. Az EC50 értékek számításakor a biolumineszcencia értékeket normalizáltam, majd a koncentráció függvényében ábrázoltam és nem-lineáris regressziós modell segítségével generáltam a koncentráció-válasz görbéket.

A biolumineszcencia gátlás értékek kiszámításához Froehner et al. (2002) képletét használtam:

$$\text{Biolumineszcencia gátlás (\%)} = (\text{SCtx} - \text{Stx}) * 100 / \text{SCtx}$$

A biolumineszcencia intenzifikációt a fenti képlet minimális módosításával (Krifaton et al. 2013) a következőképp számoltam:

$$\text{Biolumineszcencia intenzifikáció (\%)} = - 1 \times [(\text{SCtx} - \text{Stx}) * 100 / \text{SCtx}]$$

amely képletekben

SCtx – a (oldószeres) kontroll értékek matematikai átlaga bizonyos kontaktidőnél (tx)

Stx – a párhuzamos minták biolumineszcencia értékeinek átlaga bizonyos kontaktidőnél (tx)



## 5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1 *Atrazine* és *terbuthylazine* bakteriális biodegradációja

#### 5.1.1 *Egyedi törzsek biodegradációs képessége*

Az *atrazine* és *terbuthylazine* egyedi baktériumtörzsek és konzorciumok általi biológiai lebontásának mértékét kémiai analitikai módszerrel (GC-MS) detektáltam. A pozitív kontrollként használt *Pseudomonas sp.* ADP törzs a kiindulási 50 mg/L *atrazine* koncentrációt csupán 22%-kal volt képes csökkenteni a 7 napos kísérletben. A 43 vizsgált törzs közül összesen 13 volt képes egyedi kultúrában az *atrazine* 50%-os degradációjára (4. táblázat). Ezen törzsek között a *Rhodococcus* nemzetség tagjai domináltak, tíz törzs képviselte a *R. aetherivorans* (1 törzs), *R. erythropolis* (2), *R. pyridinivorans* (4), *R. rhodochrous* (1) és *R. qingshengii* (2) fajokat. A legjobb, több, mint 70%-os bontási képességet mutató törzsek szintén ehhez a nemzetséghez tartoznak: a *R. erythropolis* GD2A és *R. rhodochrous* CW25 törzsek 77 és 78%-os degradációs hatékonyságot értek el, 3 *R. pyridinivorans* törzs, a K402, K404 és K408 két *R. qingshengii*-vel együtt (BA4.9 és PT2/14B) bizonyultak a leghatékonyabb bontóknak 85-98%-os degradációval. A többi, e fajokhoz tartozó törzs kisebb, 50-65%-os képességgel rendelkezett. Előzőeken túl 3 további nemzetséghez tartozó törzs, a *Cupriavidus basilensis* OR16, a *Serratia fonticola* 1/1 és az *Olivibacter oleidegradans* TBF2/20.2 52%, 53%, illetve 67%-os bontást mutatott. A jelenleg rendelkezésre álló, elérhető szakirodalmi adatok alapján a *R. aetherivorans*, a *R. qingshengii*, az *O. oleidegradans* és a *S. fonticola* fajokat tekintve még nem írtak le *atrazine*-biodegradációs képességet.

A 4. táblázatban bemutatott biodegradációs értékek a bontási kísérletből származó „teljes” minták, azaz a bakteriális biomassza és a vizes fázis együttes analitikai vizsgálatának eredményei. Noha a szakirodalom nem számol be az *atrazine* azon tulajdonságáról, miszerint képes lehet a baktériumok sejtfalához kötődni, ennek kizárása érdekében az 50% feletti degradációs képességű törzsek esetében a bontási kísérlet végén centrifugálással szétválasztott sejtpelleten potenciálisan megkötődő *atrazine* mennyiségét is vizsgáltam kémiai analitika segítségével, ez azonban minden esetben elhanyagolható mértékű volt. Az *atrazine* biodegradáció tehát valóban a sejtek metabolikus aktivitásának, nem pedig pelleten való megkötődésnek tulajdonítható.

4. táblázat – Környezeti mintákból izolált baktériumtörzsek atrazine lebontó képessége (%) 7 nap rázatás után a VAK minta értékeihez viszonyítva. Szórás értékek azon törzsek esetében vannak megadva, melyek 50%-nál nagyobb biodegradációt mutattak és a bontási kísérleteket három ismétlésben végeztem el.

TÖRZS JELE	FAJ	ATRAZINE BIODEGRADÁCIÓ 7 NAP UTÁN (% A KONTROLL MINTÁHOZ VISZONYÍTVA)
KO10	<i>Sphingopyxis chilensis</i>	7,7
DT2	<i>Ochrobactrum tritici</i>	8,69
NZS6	<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>	10,04
NZS9	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	14,28
J4	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	20,8
DSM 11735	<i>Pseudomonas citronellolis ADP</i>	22,78
BSZ10	<i>Paracoccus kondratievae</i>	25,81
CSZ4	<i>Paracoccus kondratievae</i>	27,82
NCP3	<i>Pseudomonas putida</i>	29,35
CHB 20p	<i>Chryseobacterium hungaricum</i>	29,44
UA5/8	<i>Chryseobacterium formosense</i>	29,69
ZS1	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	34,8
FEH28	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	35,34
EL 1	<i>Microbacterium barkeri</i>	36,25
AK36	<i>Rhodococcus globerulus</i>	36,83
NZS19	<i>Bacillus megaterium</i>	36,88
AK35	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	36,98
TN4	<i>Chryseobacterium sp,</i>	40,63
NZS14	<i>Gordonia paraffinivorans</i>	41,6
H4	<i>Pseudoxanthomonas kalmensis</i>	41,74
AK40	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	42,18
T3N9	<i>Acinetobacter venetianus</i>	42,58
KO5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	43,86
AK38	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	44,27
AK37	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	44,95
BRB 6A	<i>Cupriavidus basilensis</i>	45,42
BRB1AB	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	46,78
EB22/5	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	48,91
T3SZ4	<i>Cupriavidus basilensis</i>	49,98
PT1/1	<i>Serratia fonticola</i>	51,66±1,00
NII	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	52,98±1,51
OR16	<i>Cupriavidus basilensis</i>	53,13±3,66
AK44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	59,07±3,58
CHB15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	65,65±18,39
TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	67,29±3,99
GD2A	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	77,21±13,70
CW25	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	78,41±11,59
BA4.9	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	85,0±1,10
K408	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	87,05±5,85
PT2/14B	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	93,12±1,08
K402	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	97,55±1,29
K404	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	98,12±1,22

A *terbuthylazine* biodegradációjához a fent felsorolt, legjobb *atrazine*-bontó törzsek közül négy különböző *Rhodococcus* faj képviselő törzssel végeztem el, feltételezve, hogy a nagy szerkezeti hasonlóság miatt képesek lehetnek a *terbuthylazine* bontására is. Ezek közül azonban csupán 2 volt képes valamilyen szinten degradálni a vegyületet: a *Rhodococcus pyridinivorans*-hoz tartozó K402 esetében mindössze 14%-kal (*atrazine*-bontás 25%), a K404 46%-kal (*atrazine*: 98%) csökkentette a kezdeti 50 mg/L-es koncentrációt (5. táblázat). A szakirodalmat áttekintve szintén nem találtam utalást e fajok *terbuthylazine* bontó képességére vonatkozóan. A többi faj képviselő, *atrazine*-t kiváló hatékonysággal bontó törzs esetében *terbuthylazine* degradáció nem volt megfigyelhető.

**5. táblázat – Négy különböző *Rhodococcus* faj képviselő, az *atrazine*-t legnagyobb hatásfokkal bontani képes törzsek *terbuthylazine* bontó képességének %-os értékei 7 nap rázatás után a VAK minta értékeihez viszonyítva. N.b. – nincs bontás.**

TÖRZS JELE	FAJ	TERBUTHYLAZINE BIODEGRADÁCIÓ 7 NAP UTÁN (% A KONTROLL MINTÁHOZ VISZONYÍTVA)
GD2A	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	n.b.
CW25	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	n.b.
PT2/14B	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	n.b.
K402	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	14,21
K404	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	46

### 5.1.2 Konzorciumok biodegradációs képessége

Az egyénileg 50%-os vagy annál nagyobb degradációs potenciállal rendelkező törzsekből alkotott kevert kultúrák, konzorciumok esetében 9 volt képes az *atrazine* 60-93%-át bontani a 7 napos kísérlet során. Ezek közül 5 konzorcium esetében jobb bontási hatásfokot tapasztaltam, mint az azokat alkotó egyéni törzseknél (NI1, OR16, CHB15p, AK44 és TBF2/20.2) melyek egyénileg viszonylag kisebb mértékben degradálták az *atrazine*-t. A többi konzorcium esetében nem volt megnövekedett bontás detektálható az alkotó egyéni törzsekhez képest (6. táblázat).

A *Rhodococcus pyridinivorans* CHB15p + *R. erythropolis* NI1, valamint a CHB15p és az *atrazine*-bontó képességéről újonnan beszámolt faj képviselője, a *R. aetherivorans* AK44 keverék kiemelkedő, 92 és 93%-kal a legjobb bontást mutatta a konzorciumok között. Továbbá e keverékek bontási hatékonysága 30-40%-kal meghaladta az alkotó törzsek egyéni degradációs képességét.

6. táblázat – Törzsek és a belőlük alkotott keverékek *atrazine*-degradációs képességének összehasonlítása. A biodegradációs érték a 7 napos szubmerz tenyészetben történő bontási kísérlet után kémiai analitikai módszerrel (GC-MS) visszamért *atrazine* VAK (abiotikus kontroll) mintához viszonyított százalékos értéke.

TÖRZS JELE	FAJ	TÖRZSEK EGYÉNILEG BIODEGRADÁCIÓS %	TÖRZSEK KONZORCIUMBAN BIODEGRADÁCIÓS %
NI1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	52,98±1,51	63,64±1,18
TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	67,29±3,99	
AK44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	59,07±3,58	78,34±1,39
CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	65,65±18,39	
TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	67,29±3,99	
PT2/14B	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	93,12±1,08	80,12±9,67
TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	67,29±3,99	
AK44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	59,07±3,58	80,6±12,4
TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	67,29±3,99	
NI1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	52,98±1,51	84,04±2,37
OR16	<i>Cupriavidus basilensis</i>	53,13±3,66	
K404	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	98,12±1,22	85,75±5,94
TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	67,29±3,99	
K404	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	98,12±1,22	86,34±7,12
PT2/14B	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	93,12±1,08	
AK44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	59,07±3,58	92,58±1,56
CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	65,65±18,39	
CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	65,65±18,39	93,07±0,19
NI1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	52,98±1,51	

*Terbutylazine* esetében a bontási kísérleteket két konzorciummal, az AK44+CHB15p+TBF2/2.2, illetve az AK44+CHB15p törzsek keverékeivel végeztem el, azonban a kiváló *atrazine*-bontó képességük ellenére az analitikai eredmények alapján a *terbutylazine*-t ezek a konzorciumok semmilyen mértékben nem voltak képesek degradálni.

## Új tudományos eredmény:

**I. Tézis (5.1.1. és 5.1.2. fejezetek eredményei alapján):** A vizsgált 43 baktériumtörzsből és 21 konzorciumból analitikai mérések alapján 13, ill. 9 volt képes 50%-nál nagyobb mértékben biodegradálni 50 mg/L koncentrációjú *atrazine*-t 7 nap alatt. Közülük 1 törzs a *Rhodococcus aetherivorans*, 2 törzs a *R. qingshengii*, 1 törzs az *Olivibacter oleidegradans*, 1 törzs a *Serratia fonticola* fajhoz tartozik, mely fajok *atrazine*-bontó képességét elsőként bizonyítottam. A kiváló *atrazine*-bontó (>75%) 5 törzs és 2 konzorcium közül csak a *R. pyridinivorans* K402 volt képes az *atrazine*-tól szerkezetileg csupán egy metil-csoportban eltérő *terbuthylazine* 46%-os biodegradációjára.

Az *atrazine*-ra vonatkozó eredményeket az *Ecotoxicology* nemzetközi folyóiratban közzétettük (Háhn, J., Szoboszlai, S., Tóth, G, Kriszt, B. (2017) Assessment of bacterial biodegradation of herbicide atrazine using *Aliivibrio fischeri* cytotoxicity assay with prolonged contact time. *Ecotoxicology*, 26: 648-657.).

## 5.2 *Aliivibrio fischeri* citotoxicitási tesztek

### 5.2.1 Akut és krónikus teszt érzékenységeinek összehasonlítása

A szakirodalomban, illetve a TerraBase Inc. által fejlesztett, a releváns tudományos szakirodalomban fellelhető toxicitási adatokat összegyűjtő TerraTox™ adatbázisban kevés, azonban nagy különbségeket mutató értékek lelhetők fel. Az *atrazine* akut EC<sub>50</sub> értéke 39,8-tól egészen 150 mg/L értékig terjed, míg a *terbuthylazine*-ra vonatkozóan nem találtam 30 perces kontaktidejű eredményeket: a TerraTox adatbázis egyáltalán nem tartalmaz AVF mérési adatot, a szakirodalomban csupán két értéket találtam 15 perces kontaktidejű tesztre vonatkozóan, ezek pedig 1 nagyságrendben különböznek egymástól.

Saját vizsgálataimban az előző adatokkal szemben pedig a szabványos (ISO 11348-1), 30 perces kontaktidejű akut tesztet alkalmazva sem az *atrazine*, sem a *terbuthylazine* nem okozott fénykibocsátás csökkenést a tesztszervezetben, még a legmagasabb alkalmazott koncentrációkban sem (125, ill. 100 ppm). A tapasztalt nagy különbségeknek számos oka lehet, azonban mindenképp felmerül a kérdés, hogy ezeknek a szimmetrikus-triazinoknak a vizsgálatára mennyire alkalmas az akut AVF teszt. Az akut tesztek mérési jegyzőkönyvei az M4 és M5 mellékletekben láthatók.

**7. táblázat – Az atrazine és terbuthylazine EC<sub>50</sub> értéke a meghosszabbított kontaktidejű krónikus testben összehasonlítva mind a saját mind az irodalmi az akut 30 perces Microtox® értékekkel.**

Vegyület	Krónikus AVF			Akut AVF		
	Kontaktidő	EC <sub>50</sub> (mg/L) (95% konfidencia intervallum)	r <sup>2</sup>	Kontakt- idő	EC50 értékek (mg/L)	
					saját vizsgálat	irodalmi adatok
<i>Atrazine</i>	3,5 h	28,88 (16,90-49,72)	0,6456	30 perc	n.d.	150 <sup>a,**</sup>
	10 h	2,67 (2,19-3,254)	0,8899			69,4 (68,8-70,0) <sup>b</sup>
	15 h	8,28 (6,60-10,37)	0,8477			39,9 (35,4-44,9) <sup>c</sup>
	25 h	66,51 (50,36-87,83)	0,6287			> 39,9 <sup>d,*</sup> 39,8 <sup>e,*</sup>
<i>Terbuthylazine</i>	3,5 h	4,634 (3,17-6,79)	0,6795	30 perc	n.d.	2,04 <sup>f,**</sup>
	10 h	4,97 (4,04-6,11)	0,9203			41,7 <sup>g,**</sup>
	15 h	9,62 (6,57-14,07)	0,6796			
	25 h	9,58 (5,04-18,21)	0,3305			

a TerraTox™ AQUA, Pesticides and Vibrio fischeri (Vibrio) database

b Palma et al. (2008)

c Tchounwoul et al. (2000)

d Hernando et al. (2007)

e Köck et al. (2010)

f Lopez-Roldan et al. (2012)

g Villa et al. 2012

\* konfidencia intervallum nem megadott

\*\* 15 perces kontaktidő

n.d. - nem detektálható. Toxikus hatás (biolumineszcencia gátlás) a vizsgált koncentrációkban nem volt tapasztalható

A meghosszabbított kontaktidejű, krónikus *A. fischeri* teszt egyes kontaktidőkben mért értékeinek szóródása, a számolt EC<sub>50</sub> értékek konfidencia intervallumai és a függvények illeszkedése alapján a 10 és 15 órás kontaktidők tekinthetők legmegbízhatóbb mérési pontoknak. A krónikus AVF vizsgálat eredményei szerint a tesztszervezet megnövelt kontaktidőt alkalmazva a vegyületek már viszonylag kis koncentrációjára érzékenyen reagál: az EC<sub>50</sub> értékek *atrazine* esetében 2,7 és 8,3 mg/L, a *terbuthylazine* esetében 5 és 9,6 mg/L értékeknek adódtak 10 és 15 órás expozíció után (7. táblázat).

Megfigyelhető, hogy a 15. órára kissé mérséklődik a krónikus testben a tesztszervezet érzékenysége. Ez magyarázható az *Aliivibrio fischeri* baktériumra jellemző ún. diauxikus szaporodással, mely során egy rövid lag (adaptációs) fázist követő logaritmusos szaporodási fázist a 13-15 óra körül egy újabb adaptációs, majd még egy log fázis követi, mely során elképzelhető, hogy a tesztszervezet képes lehet bizonyos mértékben alkalmazkodni a jelenlévő toxikus anyaghoz, mely biolumineszcencia gátlás csökkenésként detektálható. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az *atrazine* és *terbuthylazine* hatóanyagokra a krónikus AVF teszt a 10. órás kontaktidőnél a legérzékenyebb.

Az *atrazine* és *terbuthylazine* hatására a krónikus AVF testben mért biolumineszcencia gátlási értékek az M6 és M7 mellékletben található ábrákon láthatók.



## Új tudományos eredmény:

**II. Tézis (5.2.1. és 5.1.1 fejezetek eredményei alapján):** *Atrazine*-ra és *terbuthylazine*-ra nézve a 25 órás kontaktidejű krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt 10 és 15 órás kontaktidőnél a legérzékenyebb: *atrazine*-ra az EC<sub>50</sub> értékek 2,7 és 8,3 mg/L, a *terbuthylazine* vonatkozásában 5 és 9,6 mg/L értékeknek adódtak, ezzel szemben a szabványos, akut tesztben a legmagasabb (125, ill. 100 mg/L) vizsgált koncentrációban sem volt mérhető toxikus hatás. A két vegyület hasonló toxicitási értékei alapján – összevetve azzal, hogy a *terbuthylazine* lebontására nem voltak képesek a kiváló *atrazine*-bontó törzsek – a jelenleg *atrazine*-helyettesítőként alkalmazott *terbuthylazine* fokozott környezeti kockázatot jelent.

Az *atrazine*-ra vonatkozó eredményeket az *Ecotoxicology* nemzetközi folyóiratban közzétettük (Háhn, J., Szoboszlai, S., Tóth, G, Kriszt, B. (2017) Assessment of bacterial biodegradation of herbicide atrazine using *Aliivibrio fischeri* cytotoxicity assay with prolonged contact time. *Ecotoxicology*, 26: 648-657.).

### 5.2.2 *Atrazine és terbuthylazine bontási maradékanyagainak citotoxicitása*

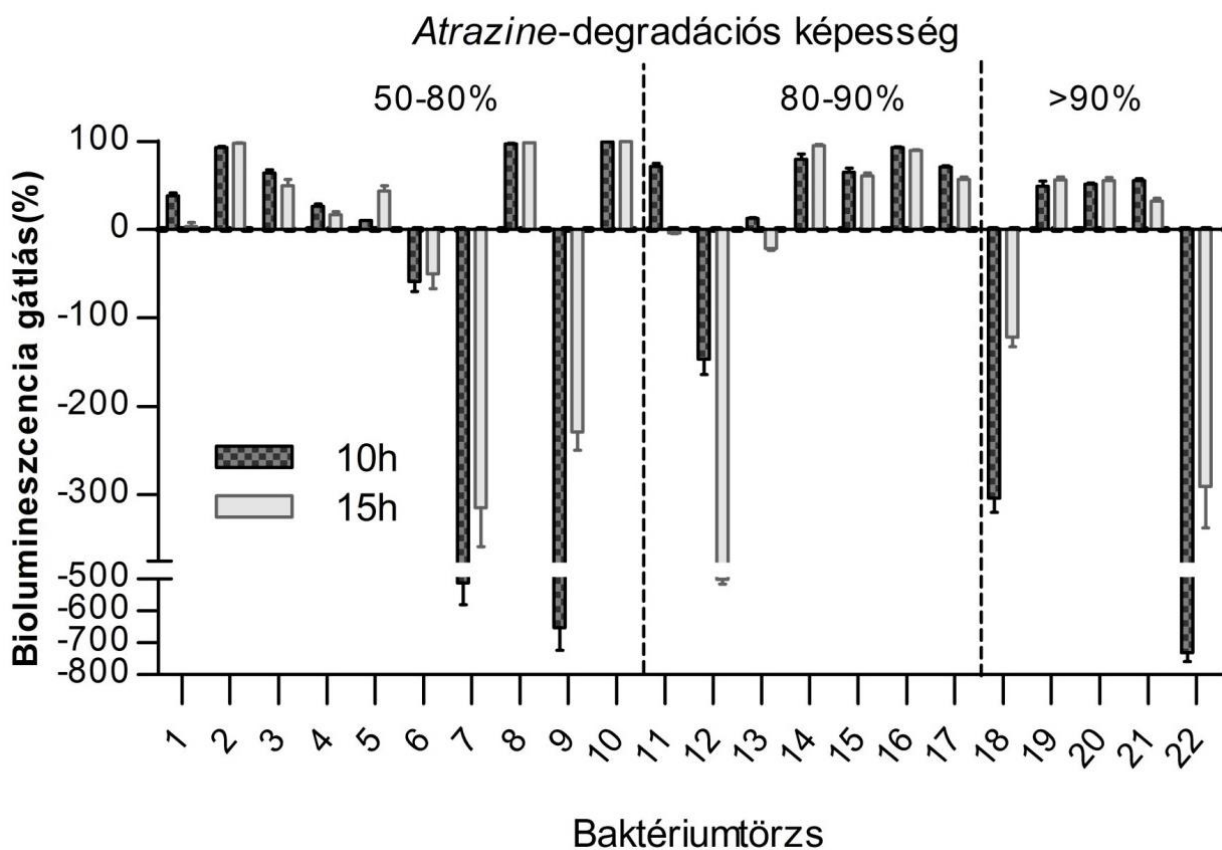
Az *atrazine* biodegradációjából származó bontási maradékanyagokat vizsgálva jelentős különbségek voltak megfigyelhetők a törzsek bontási képessége, valamint a maradékok toxicitása között, mely eredményeket összefoglalóan a 5. ábra mutatja (a továbbiakban a 5. ábra feliratában a törzseket és keverékeket jelző számok a szöveges értékelésben zárójelben szerepelnek a törzsjelek után). Összességében mindössze 3 egyéni törzs és 4 konzorcium volt képes az *atrazine*-t olyan metabolitokká bontani, melyek nem gyakoroltak toxikus hatást a tesztorganizmusokra. Az egyéni törzsek közül a *Rhodococcus pyridinivorans* CHB15p (6) és az *Olivibacter oleidegradans* TBF2/20.2 (7) törzsek közepes degradáció (65-67%) utáni maradékanyagai a 98%-os lebontó képességű K404 (22) törzséhez hasonlóan nem bizonyultak biolumineszcencia gátló hatásúnak.

Négy konzorcium, az AK44+CHB15p+TBF2/20.2 (9), AK44+TBF2/20.2 (12), NI1+OR16 (13) és AK44+CHB15p (18) esetében a maradékanyagok szintén nem mutattak citotoxikus hatást, továbbá az őket alkotó egyéni törzsek biolumineszcencia gátlásához képest az a keverékek esetében lecsökkent, ill. teljesen megszűnt. A *R. pyridinivorans* CHB15p (6) és *R. erythropolis* NI1 (2) törzseket ezek keverékeivel (19) összevetve ellentmondó eredmények voltak mérhetőek: noha a konzorcium degradációs képessége javult az alkotó törzsek egyéni értékéhez képest, addig a citotoxicitás csupán lecsökkent, de nem szűnt meg (49 és 51%-os gátlás 10 és 15 órás kontaktidőnél) az NI1 maradékához képest (93 és 97%-os gátlás), míg a CHB15p 59 és 51%-os fénykibocsátás intenzifikációjával szemben jelentősen megnövekedett. A citotoxicitás

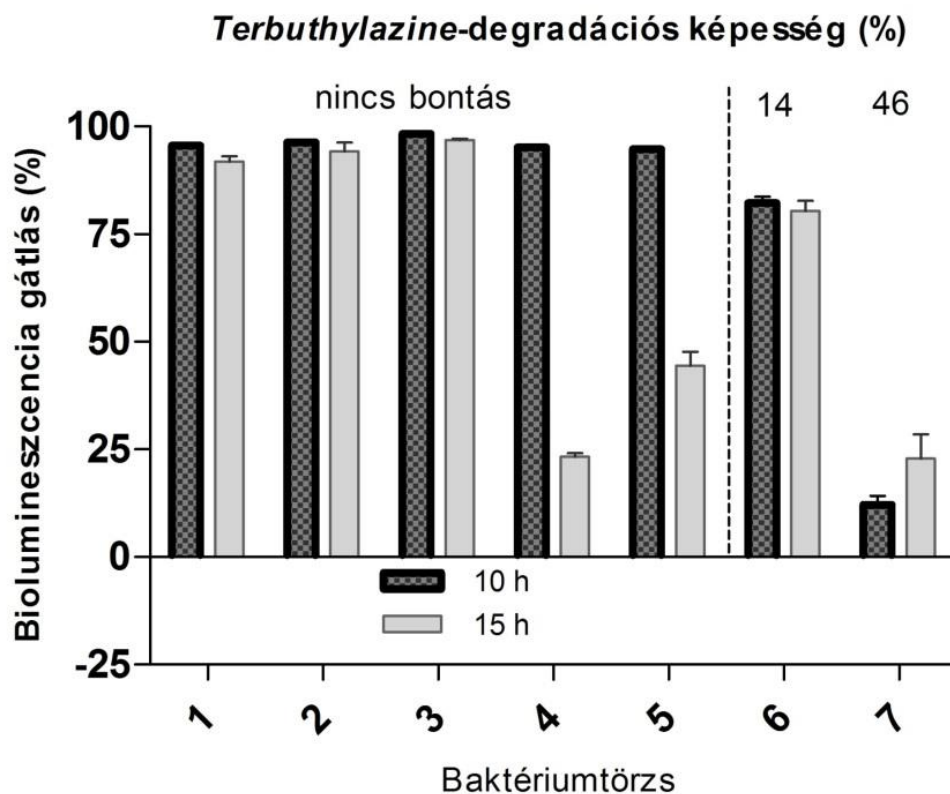
változásában ugyanez a tendencia figyelhető meg az NI1+TBF2/20.2 (5) konzorciumnál is, ez esetben azonban a degradációs hatékonyság sem javult az egyéni törzsekhez képest.

Míg a *R. pyridinivorans* K404 (22) és *O. oleidegradans* TBF2/20.2 (7) egyéni bontásból származó maradékai nem voltak toxikusak, addig a belőlük alkotott konzorcium (15) végterméke 65 és 61%-os gátlást okozott 10 és 15 órás kontaktidőnél, miközben a degradáció mértéke is csökkent a K404 egyéni eredményéhez képest.

Fentiekből tehát megállapítható, hogy az *atrazine* biodegradációjának mértéke nem áll egyenes arányban a citotoxicitás megszűnésével, illetve magas bontási hatékonyság eredményezhet toxikus maradékanyagokat.



5. ábra – 7 napos *atrazine* biodegradációs kísérletből származó maradékanyagok által kiváltott biolumineszcencia gátlás 10 és 15 órás kontaktidőnél krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben. A maradékanyagok hatás *atrazine* nélkül inkubált törzsek bakteriális anyagcseretermékeihez vannak viszonyítva. A negatív gátlási értékek a maradékanyagok által *A. fischeri*-ben kiváltott fénykibocsátás-intenzifikációt jelentik. 1 – PT1/1; 2 – NI1; 3 – OR16; 4 – AK44; 5 – NI1+TBF2/20.2; 6 – CHB15p; 7 – TBF2/20.2; 8 – GD2A; 9 – AK44+CHB15p+TBF2/20.2; 10 – CW25; 11 – PT2/14B+TBF2/20.2; 12 – AK44+TBF2/20.2; 13 – NI1+OR16; 14 – Ba4.9; 15 – K404+TBF2.20.2; 16 – K404+PT2/14B; 17 – K408; 18 – AK44+CHB15p; 19 – CHB15p+NI1; 20 – PT2/14B; 21 – K402; 22 – K404



6. ábra – 7 napos szubmerz tenyésztésben végzett *terbuthylazine* biodegradációból származó bontási maradékanyagok citotoxicitása krónikus *Aliivibrio fischeri* teszttel 10 és 15 órás kontaktidőnél, valamint a törzsek és konzorciumok *terbuthylazine* bontási képessége kémiai analitikai vizsgálat alapján. 1 – GD2A; 2 – CW25; 3 – PT2/14B; 4 – AK44+CHB15p+TBF2/20.2; 5 – AK44+CHB15p; 6 – K402; 7 – K404

A *terbuthylazine* lebontására a szerkezeti hasonlóság ellenére tehát nem voltak képesek az *atrazine*-t jól degradáló törzsek, illetve konzorciumok. Ezen törzsek és keverékek *terbuthylazine*-bontásból származó maradékanyagai toxikusak voltak a krónikus *A. fischeri* testben, mely eredményeket összefoglalóan az 6. ábra szemlélteti.

Az 6. ábra eredményei alapján látható, hogy a 4-es (AK44+CHB15p+TBF2/20.2) és 5-ös (AK44+CHB15p) konzorciumok esetében egy biolumineszcencia gátlás csökkenés - azaz a toxicitás csökkenése – tapasztalható, a kiindulási vegyület mennyiségi csökkenése nélkül. Ez Ennek egyrészt oka lehet az *A. fischeri*-re jellemző sajátos (diauxikus) szaporodási ütem (ld. 5.2.1. fejezet). Másrészt a toxicitás csökkenése a 15. órára két olyan konzorcium maradékanyaga esetében figyelhető meg, melyben egyformán megtalálhatók a *R. aetherivorans* AK44 és *R. pyridinivorans* CHB15p törzsek. Ezek a mikroszervezetek termelhetnek olyan anyagokat, melyek közvetlen vagy közvetett módon hatást gyakorolnak a biolumineszcenciára. A vizsgáltak közül két esetben volt kis/közepes mértékű degradáció tapasztalható: az *R. pyridinivorans* K402 és K404 törzsek 14 és 46%-ban csökkentették a kiindulási 50 mg/L koncentrációjú *terbuthylazine*-t (5.1.1. fejezet). Azonban ahogy az az 6. ábrán is látható, a K402 (6) törzs maradéka is citotoxikus volt, míg K404 (7) törzs esetében ugyan kisebb mértékű, 23%-

os volt 15 órás kontaktidőnél a biolumineszcencia gátlás, de a toxicitás itt sem szűnt meg teljesen.

### Új tudományos eredmény:

**III. Tézis (5.1.2 és 5.2.2 fejezetek eredményei alapján):** A 25 órás kontaktidejű krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt alkalmas az *atrazine* és a *terbuthylazine* hatóanyagok biodetoxifikációjának nyomon követésére. Az *atrazine*-t egyénileg jól bontó törzsek degradációs termékeinek citotoxicitását vizsgálva mindössze 3 esetben (2 *Rhodococcus pyridinivorans* és 1 *Olivibacter oleidegradans* törzs) nem volt toxikus a maradékanyag. 4 konzorcium esetében a biodegradáció mértéke meghaladta az azokat alkotó törzsekét a maradékanyagok toxicitásának megszűnésével, tehát a baktériumtörzsek együttesen képesek a hatékonyabb lebontásra és detoxifikációra.

Az *atrazine*-ra vonatkozó eredményeket az *Ecotoxicology* nemzetközi folyóiratban közöltük (Háhn, J., Szoboszlai, S., Tóth, G, Kriszt, B. (2017) Assessment of bacterial biodetoxification of herbicide atrazine using *Aliivibrio fischeri* cytotoxicity assay with prolonged contact time. *Ecotoxicology*, 26: 648-657.).

### 5.3 Az *atrazine* indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálata

Az *atrazine* szteroidszintézist megzavaró hatásának detektálására olyan kombinált módszert dolgoztam ki, mely ötvözi a szteroidogenezis vizsgálatára alkalmas H295R humán adrenokortikális karcinóma sejtvonalat és az ösztrogén, ill. androgén hatás mérésére alkalmas *Saccharomyces cerevisiae* alapú BLYES és BLYAS bioriportereket.

Az *atrazine*-ről, valamint a két dealkilezett bomlástermékéről (DEA, DIA) a tudományos szakirodalom alapján ismert, hogy az aromatizáció útján androszténdiont és tesztoszteront ösztronná és ösztradiollá átalakító aromatáz enzim indukciójára képes, melynek eredménye az emelkedett ösztrogénszint, ezzel párhuzamosan számos kísérletben csökkent tesztoszteron-szint volt mérhető. A szteroidszintézis egyéb folyamataira gyakorolt potenciális hatása(i) még nem ismert(ek). Az *atrazine* hatására megnövekedett hormonhatás detektálására az élesztő alapú bioriporter tesztek alkalmasak.

Az összes, BLYES és BLYAS teszt elvégzése során pozitív kontroll vegyületeket is alkalmaztam, E2-t a BLYES, DHT-t a BLYAS tesztben. Az EC<sub>50</sub> értékek (az elvégzett tesztekben mért értékek átlaga az SD értékekkel) 6,46±3,7E-04 µM volt az E2, valamint 3,91±2,0E-03 µM a DHT esetében. A szakirodalmi EC<sub>50</sub> adatokkal összevetve, melyek

6,3±2,4E-04 µM E2-re és 1,1±0,5E-02 DHT-ra (Sanseverino et al. 2008), megállapítható volt, hogy a tesztszervezetek megfelelő mértékben érzékenyek és a hormonhatás mérésére alkalmasak voltak minden tesztben.

### 5.3.1 Keresztreakció a BLYES és BLYAS tesztek között

A BLYES és BLYAS tesztekben tapasztalható volt keresztreakció, melynek értékeit a 8. táblázat mutatja: a BLYAS tesztben az E2 androgén hatása közel 30-szor volt gyengébb, mint a DHT hatása, a BLYES tesztben a DHT pedig majdnem 600-szor gyengébb ösztrogén aktivitást mutatott, mint az E2. A humán sejtek által az *atrazine* expozíció hatására termelt ösztrogének és androgének hormonhatása megközelítőleg 60 000-szer és 7 000-szer volt gyengébb, mint az E2-é, ill. a DHT-é. Az *atrazine* azon hatásos koncentrációi (EC<sub>50</sub>) a szteroidogenezis tesztben, melynek hatására olyan mértékben emelkedtek meg a humán sejtek által termelt ösztrogének és androgének szintje, hogy a bioripporter tesztben a maximális ösztrogén és androgén hatás 50%-t eredményezzék, megközelítőleg azonosak (8. táblázat). Ebből kifolyólag az a következtetés vonható le, hogy az emelkedett ösztrogén és androgén hatást, amit a BLYES és BLYAS tesztben detektáltam, valóban az ösztrogén és az androgén hormonok emelkedett mennyisége okozta, nem pedig az ösztrogének androgén receptorokkal, ill. az androgén ösztrogén receptorokkal való keresztreakciója miatt alakult ki.

**8. táblázat – Keresztreakció a BLYES és BLYAS tesztek között, valamint a relatív ösztrogén és androgén aktivitás a vegyületeket a megfelelő teszt standardhez viszonyítva. \*A vegyület EC<sub>50</sub> értékének és megfelelő teszt standard EC<sub>50</sub> értékének hányada**

Vegyület	BLYES teszt		BLYAS teszt	
	Ösztrogén aktivitás*	EC <sub>50</sub> (µM)	Androgén aktivitás*	EC <sub>50</sub> (µM)
E2	1	2,740E-04	1/27	1,290E-01
DHT	1/571	1,570E-01	1	4,730E-03
H295R felülülő <i>atrazine</i> expozíció után	1/61350	1,678E+01	1/7256	3,438E+01

### 5.3.2 A tiszta testanyagok ösztrogén és androgén hatása

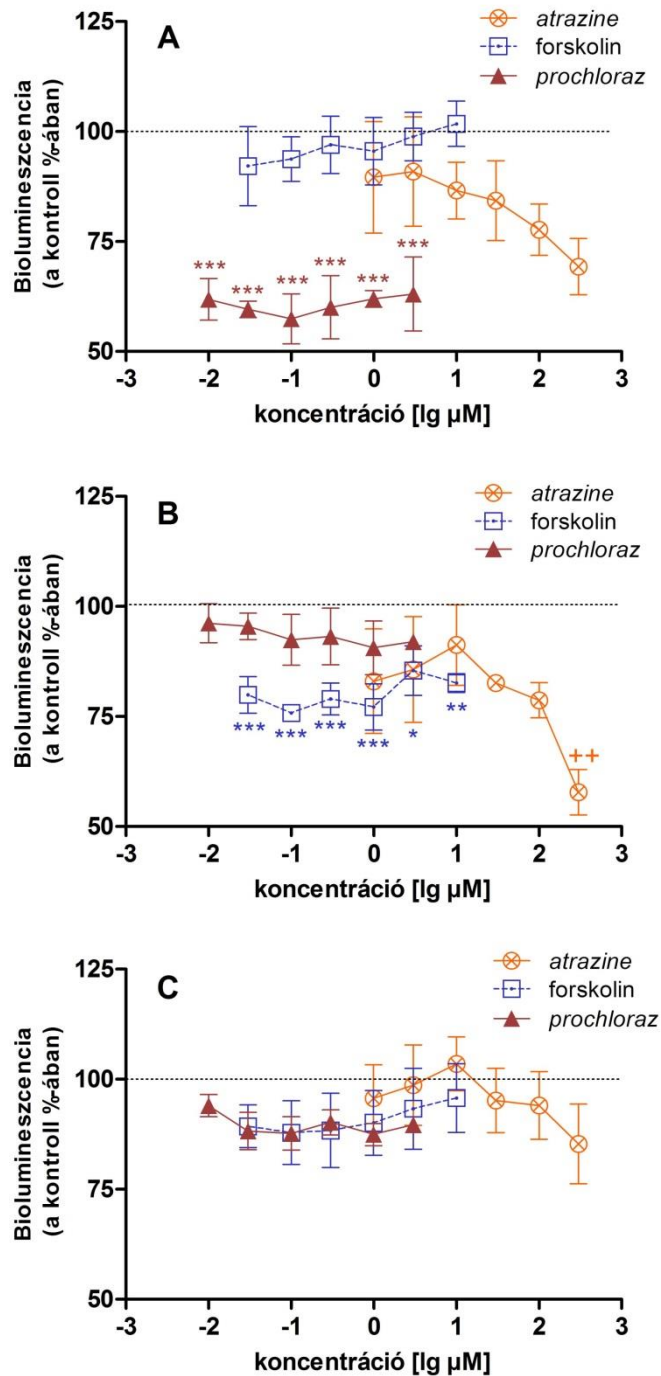
Annak meghatározására, hogy a testanyagok önmagukban vajon képesek lehetnek-e az ösztrogén és androgén receptorokhoz kapcsolódni, azaz a forskolin, *prochloraz* és *atrazine* közvetlenül okozhatnak-e biolumineszcencia növekedést, a tiszta testanyagokat a BLYES és BLYAS tesztben megvizsgáltam. Citotoxicitás mérésére a BLYR tesztet használtam. Az anyagok tesztelésénél alkalmazott koncentrációtartományok megegyeztek a szteroidogenezis tesztben is vizsgált tartományokkal. Az egyes testanyagok hatására bekövetkező biolumineszcencia változásokat %-ban fejeztem ki az oldószeres (DMSO) kontrollhoz viszonyítva, melyek a 7. ábrán láthatók. A vegyületek közül egyik sem bizonyult még a

legnagyobb koncentrációban sem citotoxikus hatásúnak a BLYR tesztben: a forskolin 4,3-12,1%, a *prochloraz* 6-12,6%, míg az *atrazine* 14,7%-os fénykibocsátás csökkenést eredményezett, ezen értékek pedig nem különböztek szignifikánsan az oldószeres kontrollhoz képest.

A BLYES és BLYAS tesztben egyik tesztanyag hatására sem tapasztaltam biolumineszcencia intenzifikációt.

Noha a BLYR tesztben egyik vegyület sem bizonyult toxikusnak, a BLYAS tesztben szignifikáns csökkenés volt mérhető *prochloraz* esetében, a BLYES tesztben pedig az *atrazine* és forskolin hatására, mely utóbbinak legjobb ismereteim szerint nincsenek citotoxikus hatásai. Azonban annak ellenére, hogy statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak, ezek az fénykibocsátás-csökkenés értékek csekély mértékűek, valamint meg kell jegyezni, hogy mind a BLYES, mind a BLYAS szervezetek alap fénykibocsátása mérsékelt (hiszen arra tervezték őket, hogy biolumineszcencia intenzifikációval válaszoljanak olyan vegyületek jelenlétére, melyek képesek közvetlenül az ösztrogén és androgén receptorokhoz kötődni), tehát viszonylag kismértékű csökkenés is jelentősnek hathat. Ezzel szemben a BLYR törzs alap fénykibocsátása a BLYES és BLYAS-nál 2 nagyságrenddel nagyobb. A *prochloraz*-ról pedig tudni kell, hogy egy imidazol-típusú, ergoszterol szintézist gátló fungicid vegyület (Paranjape et al. 2014), tehát az általa kiváltott csökkenés a vegyület anti-fungális hatásával is magyarázható. Sanseverino és mtsai (2008) kutatásai szerint az *atrazine* viszonylag nagy koncentrációban fejt csak ki toxikus hatást ( $IC_{20}$ :  $5,3E+02 \mu M$  a BLYR tesztben), mellyel saját mérési eredményem összhangban van, a legnagyobb, 15%-os biolumineszcencia csökkenés csak a legmagasabb,  $3E+02 \mu M$ -os koncentrációban volt megfigyelhető.

A fent bemutatott eredmények alapján megállapítható, hogy a tiszta tesztanyagok önmagukban nem képesek fénykibocsátás növekedést okozni a bioripporter tesztekben, illetve nem képesek közvetlenül sem az ösztrogén, sem az androgén receptorokhoz kötődni. A humán sejtek felülűszóját a bioripporter tesztekkel vizsgálva tehát kizárható, hogy biolumineszcencia emelkedés esetén a tiszta tesztanyagok lennének a hatás kiváltásért felelősek.



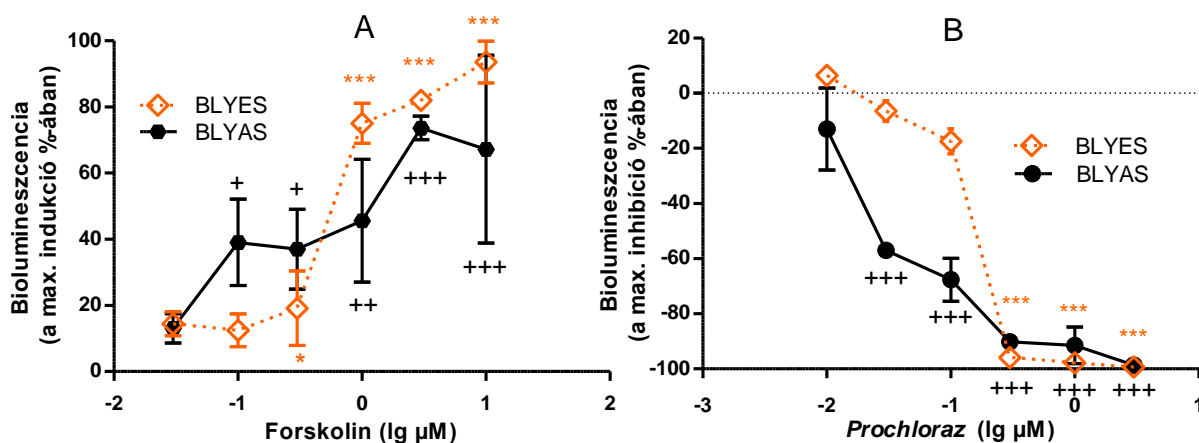
7. ábra – Ösztrogén, androgén és citotoxikus hatás a BLYES (A), BLYAS (B) és BLYR (C) tesztekben az élesztősejtek tiszta tesztanyagokkal történő 5 órás expozíciója után. A biolumineszcencia értékek a kontroll (BLYES/BLYAS/BLYR+DMSO; 100%) arányában vannak kifejezve. Szignifikancia megállapítására egyutas ANOVA és Tukey post hoc tesztet alkalmaztam. (\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrollhoz képest ( $p < 0,05$ ); (\*\*,++) szignifikánsan eltér az oldószeres kontrollhoz képest ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*,+++)  
szignifikánsan eltér az oldószeres kontrollhoz képest ( $p < 0,001$ ).

### 5.3.3 H259R sejtek szteroidogenezis tesztből származó felülűszóinak hormonhatása

A tiszta tesztanyagok bioripporter tesztekkel történő vizsgálata után a szteroidogenezis tesztből származó felülűszó minták hormonhatását mértem.

A pozitív kontroll anyagokkal (forskolin és *prochloraz*), valamint *atrazine*-nal kezelt H295R sejtek felülűszói egyik esetben sem bizonyultak citotoxikus hatásúnak a BLYR tesztben.

Az indukáló hatású forskolin és gátló *prochloraz* H295R sejtekben a nemi hormonok egyidejűleg történő termelődésére gyakorolt hatását a BLYES és BLYAS tesztekkel vizsgáltam (8. ábra).



**8. ábra - A koncentráció-válasz görbék a H295R sejtek 48 órás forskolin és *prochloraz* (pozitív kontroll vegyületekkel) történő expozíció után gyűjtött felülűszói által kiváltott ösztrogén (A) és androgén hatást (B) mutatják a BLYES és BLYAS tesztekben (maximális indukció = 100%; maximális inhibíció = -100%). Szignifikancia megállapítására egyutas ANOVA és Tukey post hoc tesztet alkalmaztam. (\*,+) szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest ( $p < 0,05$ ); (\*\*,++) szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*,+++)**

szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest ( $p < 0,001$ ).

A H295R sejtek forskolin és *prochloraz* expozíciója utáni, a sejtek által termelt ösztrogén és androgén hormonok jelenlétére kapott válaszreakció a BLYES és BLYAS tesztben megfelelt az elvárásoknak. A forskolinnal kezelt sejtek felülűszója mindkét tesztben biolumineszcencia emelkedést, míg a *prochloraz*-zal kezelték csökkenést idézett elő (8. ábra). A legkisebb megfigyelhető hatásos koncentráció 0,3 és 0,1 μM volt a forskolinnál, illetve 0,3 és 0,03 μM a *prochloraz*-nál, melyek hatására a H295R sejtek felülűszói szignifikáns emelkedést eredményeztek a BLYES és BLYAS tesztek fénykibocsátásában. 10 μM forskolin kezelés hatására a fokozottan termelődő hormonok 38%-os intenzifikációt okoztak a BLYES tesztben, ill. 67%-os növekedést a BLYAS tesztben a csupán oldószerral kezelt sejtek felülűszójához képest.

3 μM *prochloraz* teljesen blokkolta a humán sejtek alap aromataz aktivitását (azaz ösztrogén produkciót), mely 92%-os biolumineszcencia csökkenésben nyilvánult meg a BLYES tesztben, míg a lecsökkent androgén hatás 76%-kal alacsonyabb fénykibocsátást eredményezett a BLYAS-ban. A forskolin és *prochloraz* expozíció utáni humán sejt felülűszók által BLYES és



BLYAS tesztben kiváltott fénykibocsátás intenzifikációs %-ok az M8 mellékletben láthatók grafikusán.

A BLYES és BLYAS tesztekben mért  $EC_{50}$  értékek  $6,09E-01 \mu\text{M}$  és  $8,3E-01 \mu\text{M}$  volt forskolinra, valamint  $1,4E-01 \mu\text{M}$  és  $3,58E-02 \mu\text{M}$  *prochloraz*-ra.

Ezek az értékek beleesnek azokba az OCSPP Guideline szerinti elvárható tartományokba, melyeket a pozitív kontroll anyagoknak kell kiváltaniuk a H295R sejtek hormontermelésében (9. táblázat).

**9. táblázat – Az OCSPP Steroidogenesis assay Guideline alapján elvárt és a kombinált módszerrel mért  $EC_{50}$  értékek összehasonlítása a pozitív kontroll forskolin és *prochloraz* vonatkozásában.**

Induktor/Inhibitor	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) értékek			
	E2 <sup>a</sup>	T <sup>a</sup>	BLYES <sup>b</sup>	BLYAS <sup>b</sup>
Forskolin	0,3 – 3,0	0,2 – 2,0	0,609	0,830
<i>Prochloraz</i>	0,03 – 0,3	0,01 - 0,1	0,140	0,0358

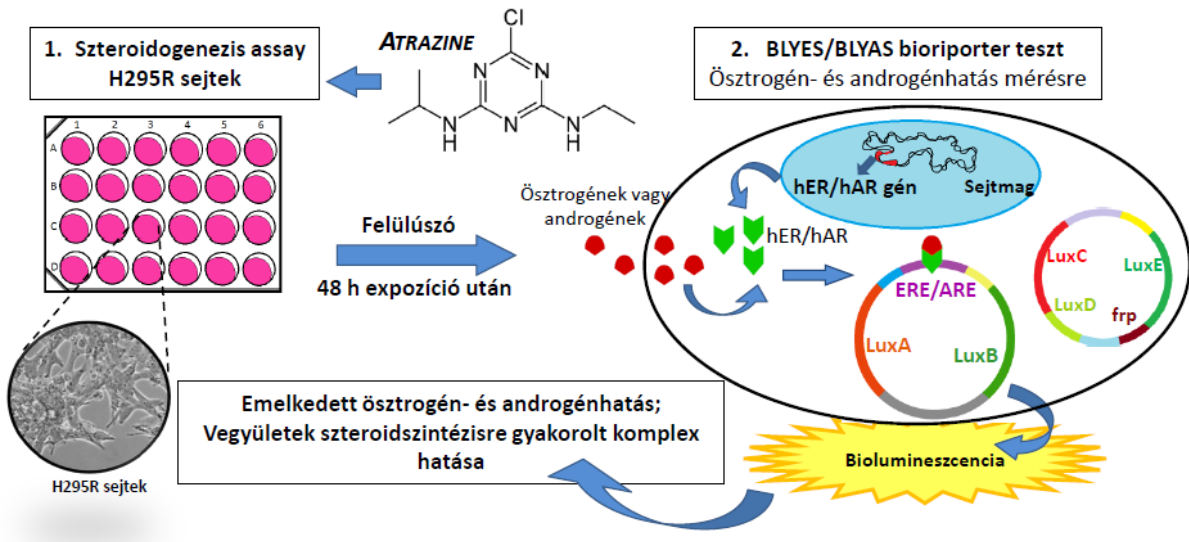
<sup>a</sup> Elvárt  $EC_{50}$  értékek forskolinra and *prochloraz*-ra végpontként  $17\beta$ -ösztradiolt (E2) és tesztoszteront (T) mérve (OCSPP Guideline 890.1550)

<sup>b</sup>  $EC_{50}$  értékek forskolinra és *prochloraz*-ra a hormonhatást az élesztő alapú bioripporter tesztet használva (BLYES az ösztrogén hatás mérésére, BLYAS az androgen hatás mérésére)

Ezek alapján megállapítható, hogy a BLYES és BLYAS bioripporter tesztek érzékenysége megfelel a Guideline által megkövetelteknek a hormonmérő rendszert illetően.

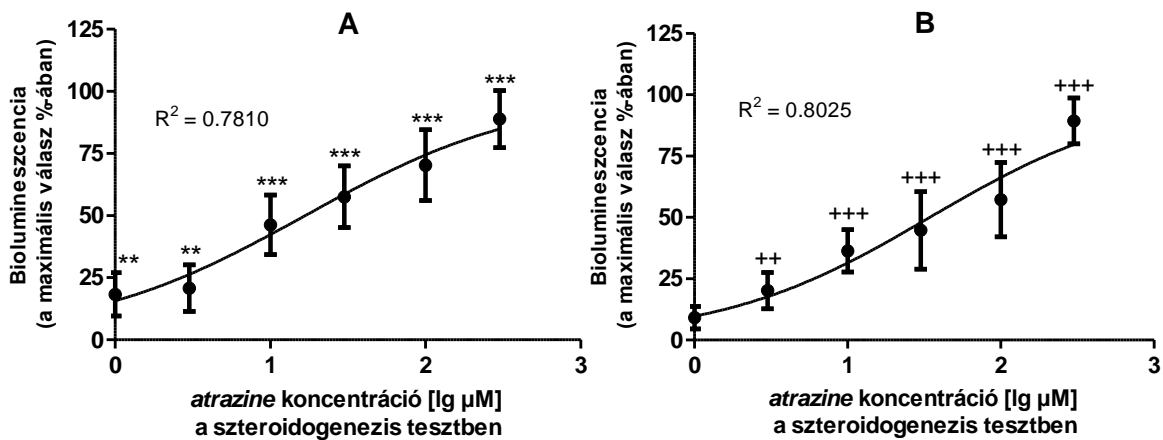
*Atrazine*-nal exponált sejtek felülúszóinak esetében mind a BLYES, mind a BLYAS tesztben koncentráció-függő módon emelkedett ösztrogén és androgén hatást mértem (a kombinált tesztet sematikusán a 9. ábra mutatja be), melyek alapján az *atrazine* az ösztrogének és androgének termelődésére is induktív hatást gyakorolt a H295R sejtekben.

A legkisebb, már megfigyelhető hatást  $1$  és  $3 \mu\text{M}$  koncentrációjú *atrazine* expozíció okozta a humán sejtekben, melyek hatására szignifikánsan megemelkedett ösztrogén és androgén hatás volt tapasztalható a bioripporter tesztekben.  $10 \mu\text{M}$  feletti *atrazine* kitettség olyan mértékű emelkedett ösztrogéntermelést okozott a humán sejtekben, melyek több, mint 20%-os biolumineszcencia intenzifikációt eredményeztek a BLYES tesztben,  $100$  és  $300 \mu\text{M}$ -os koncentrációnál ezek az értékek már 40% és 52% voltak. A BLYAS teszt azt mutatta, hogy  $30$ ,  $100$  és  $300 \mu\text{M}$  *atrazine* volt képes az androgén produkciót megnövelni a humán sejtekben, melyek 23, 31 és 48%-os fénykibocsátás intenzifikációt okoztak az oldószeres kontrollhoz képest (az intenzifikációs értékek az M9 mellékletben láthatók grafikusán).



9. ábra – Az atrazine és bontási maradékanyagainak indirekt szteroidszintézist megzavaró hatásának kimutatására kidolgozott kombinált módszer sematikus ábrája (Saját készítésű ábra).

A maximális biolumineszcencia 50%-át okozó ( $EC_{50}$ ), H295R sejtek fokozott ösztrogén és androgén termelése  $16,78 \mu\text{M}$  (BLYES), ill.  $34,38 \mu\text{M}$  (BLYAS) atrazine expozíció során következett be. Az atrazine expozíció hatására koncentráció függő módon a humán sejtek által termelt nemi hormonok BLYES és BLYAS tesztben mért ösztrogén- és androgén hatását a 10. ábra koncentráció-válasz görbéi mutatják, melyeket az  $EC_{50}$  értékek számításához használtam.



10. ábra – A koncentráció-válasz görbék a H295R sejtek 48 órás atrazine expozíció után gyűjtött felülűzői által kiváltott ösztrogén (A) és androgén hatást (B) mutatják a BLYES és BLYAS tesztekben (maximális válasz = 100%). Szignifikancia megállapítására egyutas ANOVA és Tukey post hoc tesztet alkalmaztam. (\*\*,++) szignifikánsan eltér a kontrolltól ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*,+++), szignifikánsan eltér a kontrolltól ( $p < 0,001$ ).

### Új tudományos eredmény

**IV. Tézis (5.3 fejezet eredményei alapján):** Az *atrazine* indirekt, nemi hormonok szintézisét megzavaró hatásának kimutatására sikeresen fejlesztettem ki egy új, kombinált módszert a H295R humán mellékvesekéreg karcinóma sejtvonalat alkalmazó *steroidogenesis assay*, valamint a BLYES/BLYAS ösztrogén/androgén hatást mérő, élesztő alapú bioripporter teszt összekapcsolásával.

Az eredményeket a *Chemosphere* nemzetközi folyóiratban adtuk közre (Háhn, J., Szoboszlay, S., Krifaton, C., Kovács, K. J., Ferenczi, S., Kriszt, B. (2016) Development of a combined method to assess the complex effect of atrazine on sex steroid synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 154, 507-514.).

### Új tudományos eredmény

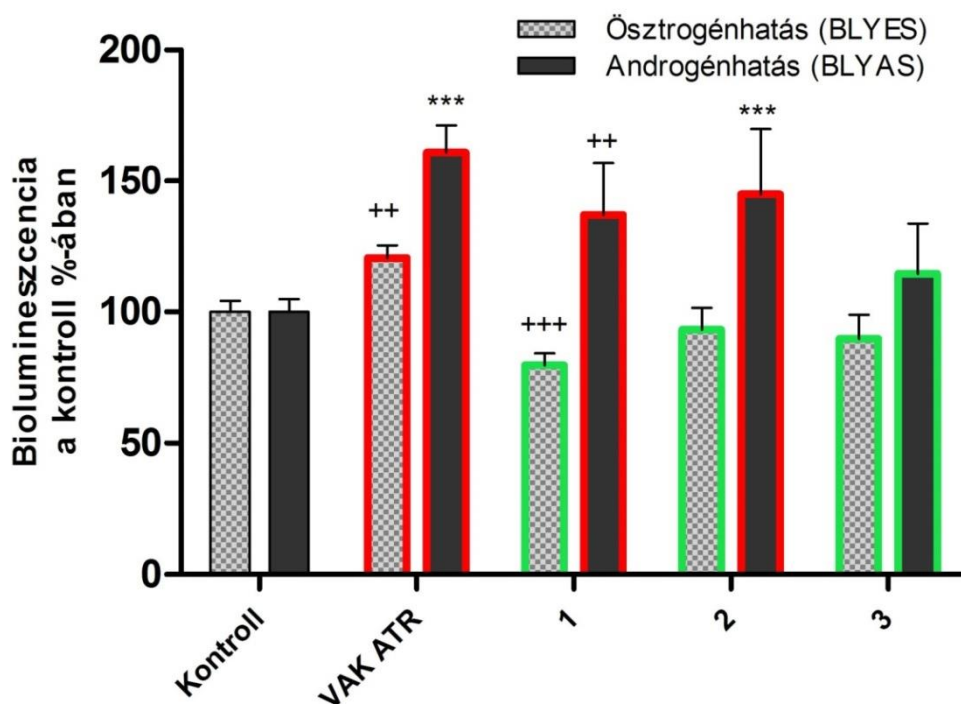
**V. Tézis (5.3 fejezet eredményei alapján):** A kombinált módszerrel mért eredmények alapján az *atrazine* a H295R sejtekben mind az ösztrogén, mind az androgén hatású hormonok szintézisére induktív hatást gyakorol ( $EC_{50}$  értékek ösztrogénhatás esetében 16,78  $\mu$ M, androgénhatás esetében 34,38  $\mu$ M). A módszer alkalmas egyes vegyületek indirekt endokrin diszruptor hatásainak detektálására előre determinált kémiai/immunanalitikai mérési végpontok meghatározása nélkül, ezzel lehetőséget nyújt addig ismeretlen biológiai hatások felderítésére.

Az eredményeket a *Chemosphere* nemzetközi folyóiratban adtuk közre (Háhn, J., Szoboszlay, S., Krifaton, C., Kovács, K. J., Ferenczi, S., Kriszt, B. (2016) Development of a combined method to assess the complex effect of atrazine on sex steroid synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 154, 507-514.).

## 5.4 *Atrazine* biodegradációból származó maradékanyagok indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálata

Az *atrazine* baktériumok által történő lebontása során keletkező két leggyakoribb, dealkilezett bontási maradékanyag, a DEA és DIA esetében korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az *atrazine*-hoz hasonlóan szintén képesek aromatáz-induktorként hatni H295R sejtekben (Sanderson et al. 2001). Doktori munkám fő célja, hogy olyan baktériumtörzseket találjak, melyek káros biológiai hatással nem rendelkező maradékanyagokká képesek degradálni a vizsgált peszticideket. Ezért az előző fejezetekben bemutatott, a nemi hormonok szintézisét indirekt megzavaró hatású vegyületek detektálására kifejlesztett kombinált módszert olyan, *atrazine* biodegradációs maradékanyagok vizsgálatára használtam, melyek kémiai analitikai

mérések alapján kiváló bontási hatékonyságot mutattak, valamint a maradékanyagok nem bizonyultak citotoxikus hatásúnak a krónikus *A. fischeri* tesztben. Ennek keretében a *R. pyridinivorans* K404 törzs, az egyetlen háromtagú AK44+CHB15p+TBF2/20.2 (*R. aetherivorans* + *R. pyridinivorans* + *O. oleidegradans*) és az AK44+CHB15p konzorciumok bontási maradékanyagát vizsgáltam a kombinált teszttel. A vizsgálat eredményeit a 11. ábra mutatja be, melyben a kontrollhoz (H295R sejtek+médium) képest szignifikánsan megemelkedett ösztrogén és/vagy androgén hatást piros kerettel elátott oszlopok, míg a kontrollhoz képest megnövekedett hormonhatást nem mutató mintákat zöld keretű oszlopok jelzik.



11. ábra – Az *atrazine*-bontásból származó, nem citotoxikus hatású maradékanyagokkal 48 órán át exponált H295R humán adrenokortikális karcinóma sejtek által termelt nemi hormon révén BLYES és BLYAS tesztekben kiváltott ösztrogén és androgén hatás. (++) szignifikáns különbség a Kontrollhoz képest ( $p < 0,002$ ); (+++,\*\*\*) szignifikáns különbség a kontrollhoz (H295R+medium) képest ( $p < 0,0002$ ). Piros keret – kontrollhoz képest emelkedett hormonhatás. Zöld keret – kontrollhoz képest nincs emelkedett hormonhatás. VAK ATR – abiotikus kontroll bontási kísérletben (tápanyag + *atrazine*); 1 – K404; 2 – AK44+CHB15p+TBF2/20.2; 3 – AK44+CHB15p

Citotoxikus hatás egyik minta esetében sem volt mérhető a BLYR tesztben. A biodegradációs kísérletekből származó VAK mintával (csak LB tápanyag és 50 mg/L *atrazine*) exponált humán sejtek felülűszoi az elvárásoknak megfelelően emelkedett ösztrogén és androgén hatást váltottak ki a bioripporter tesztekben a kontrollhoz (H295R médium + LB) képest. A bakteriális anyagcsere-termékek hatásaival korrigált bontási maradékanyagok hatásai alapján az látható (11. ábra), hogy a fokozott ösztrogénprodukciónak mindhárom esetben elmaradt a humán sejtekben, a kontroll értékével megegyezik (nincs szignifikáns eltérés), vagy ahhoz képest

szignifikánsan lecsökkent (K404). Az androgén hatást tekintve viszont már más a kép: a kiváló, 98%-os bontási képességű K404 törzs, illetve a három tagból álló AK44+CHB15p+TBF2/20.2 keverék degradációs maradékával kezelt H295R sejtek felülűszója is kismértékben, de a kontrollhoz képest szignifikánsan megemelte a BLYAS tesztben a fénykibocsátást (37, ill. 45%-os intenzifikáció). Egyedül a legjobb *atrazine* bontó képességű (93%) AK44+CHB15p konzorcium bontási maradékanyaga nem okozta a humán sejtekben az androgén hormonok fokozott termelődését (14%-os intenzifikáció, amely nem volt statisztikailag igazolható eltérés a kontrollhoz képest).

### **5.5 Összegzés: *atrazine* és *terbuthylazine* biodetoxifikációja az alkalmazott biológiai hatásmérő tesztek eredményei alapján**

A citotoxicitást mérő meghosszabbított, 25 órás kontaktidejű krónikus *A. fischeri* teszt eredményei alapján az 50% feletti degradációs képességű 13 törzs közül a *R. pyridinivorans* K404-et, a 9 konzorcium közül pedig kettőt (AK44+CHB15p+TBF2/20.2 és AK44+CHB15p) a kifejlesztett, indirekt szteroidszintézist zavaró hatás mérésére alkalmas kombinált módszerrel is megvizsgáltam. A kiválasztott törzs és konzorciumok 80-98%-os bontási képességet mutattak analitikai mérések szerint, valamint ezeknek a bontási maradéka nem volt citotoxikus hatású az AVF tesztben. A konzorciumok közül azért esett a választás az AK44+CHB15p+TBF2/20.2 keverékre, noha volt hasonló képességű más konzorcium is (AK44+TBF2/20.2 és NI1+OR16), mert ez volt az egyetlen, amelyik három különböző fajt képviselő törzsből állt és a konzorcium bontási hatékonysága mindhárom alkotó törzset meghaladta. Emiatt feltételezhető volt, hogy ezek a törzsek képesek együttesen, egymás enzimkészletét kiegészítve hatékonyabban bontani az *atrazine*-t, illetve remélhetőleg olyan szintig elvégezni a molekula bontását, hogy a keletkező maradékanyagok nem fognak indirekt endokrin diszruptor hatás gyakorolni. A három maradékanyag közül azonban egyedül az AK44 és CHB15p törzsekből álló 2 tagú konzorcium volt az, melynek degradációs végterméke nem gyakorolt indukáló hatást a humán H295R mellékvesekéreg karcinóma sejtek nemi hormon termelésére.

Az analitikai mérések szerint 50%-nál jobb *atrazine*-bontó törzsek bontási képességét, a maradékanyagok citotoxicitását és a vizsgált minták esetében az indirekt endokrin diszruptor hatást összefoglalva a 10. táblázat mutatja.

10. táblázat– Az *atraxine* kémiai analitikával mért biodegradációja egyéni törzsek és konzorciumok által, valamint a maradékanyagok citotoxicitása meghosszabbított kontaktidejű (25 óra) *Alivibrio fischeri* tesztben 10 és 15 órás kontaktidőnél mért biolumineszcencia gátlásban kifejezve; továbbá a nem citotoxikus maradékanyagok indirekt szex-szteroid szintézisét zavaró hatás a maradékanyagokkal 48 órán át exponált H295R sejtek által termelt hormonok BLYES és BLYAS tesztben okozott ösztrogén és androgén hatása biolumineszcencia intenzifikációjában kifejezve. N.v. – nem vizsgált.

Faj	Törzs(ek)	GC-MS <i>Atraxine</i> biodegradáció (%)	<i>Alivibrio fischeri</i> teszt Gátlás (%)		EID hatás mérő kombinált teszt (H295R szeoridiszintézis assay +BLYES/BLYAS Ösztrogén hatás Androgén hatás Biolumineszcencia intenzifikáció (%)
			10 h kontaktidő	15h kontaktidő	
<i>Serratia fonticola</i>	PT1/1	51,66±1,00	37,99±3,01	3,04±4,09	n.v.
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NI1	52,98±1,51	92,94±1,00	97,45±4,44	n.v.
<i>Cupriavidus basilensis</i>	OR16	53,13±3,66	64,17±4,14	49,2±3,38	n.v.
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	AK44	59,07±3,58	26,07±7,46	16,44±0,04	n.v.
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	CHB15P	65,65±18,39	-59,16±15,34	-50,51±4,99	n.v.
<i>Olivibacter oleidegradans</i>	TBF2/20.2	67,29±3,99	-512,93±9,29	-314,22±10,04	n.v.
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	GD2A	77,21±13,70	96,98±0,42	98,25±7,25	n.v.
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	CW25	78,41±11,59	99,17±0,09	99,56±0,08	n.v.
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	Ba4.9	85,0±1,10	79,71±5,53	94,89±1,04	n.v.
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	K408	87,05±5,85	70,88±1,70	57,04±3,21	n.v.
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	PT2/14B	93,12±1,08	51,21±2,39	55,25±5,32	n.v.
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	K402	97,55±1,29	55,45±2,64	31,86±9,12	n.v.
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	K404	98,12±1,22	-731,45±2,96	-290,39±13,08	-20,29±4,61 37,14±19,74
<i>R. erythropolis</i> + <i>O. oleidegradans</i>	NI1 + TBF2/20.2	63,64±1,18	9,72±3,18	43,33±3,43	n.v.
<i>R. aetherivorans</i> + <i>R. pyridinivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	AK44 + CHB15p + TBF2/20.2	78,34±1,39	-653,18±8,76	-228,58±7,38	-6,74±8,28 44,85±25,06
<i>R. qingshengii</i> + <i>O. oleidegradans</i>	PT2/14B + TBF2/20.2	80,12±9,67	71,81±3,04	-3,77±13,17	n.v.
<i>R. aetherivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	AK44 + TBF2/20.2	80,60±12,42	-146,63±9,66	-501,46±15,68	n.v.
<i>R. erythropolis</i> + <i>C. basilensis</i>	NI1 + OR16	84,04±2,37	12,84±3,31	-21,72±3,96	n.v.
<i>R. pyridinivorans</i> + <i>O. oleidegradans</i>	K404 + TBF2/20.2	85,75±5,94	65,13±5,43	60,79±4,90	n.v.
<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. qingshengii</i>	K404 + PT2/14B	86,34±7,12	92,98±0,33	89,86±0,24	n.v.
<i>R. aetherivorans</i> + <i>R. pyridinivorans</i>	AK44 + CHB15p	92,58±1,56	-303,45±4,34	-122,04±0,07	-10,17±9,07 14,66±19,02
<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. erythropolis</i>	CHB15p + NI1	93,07±0,19	48,60±10,94	56,10±4,23	n.v.

Összegezve tehát a 22 egyedi törzs és konzorcium közül 7 esetben nem volt sejttoxikus a maradékanyag, az ezekből választott 3 mintából pedig csupán 1 esetben szűnt meg teljesen az indirekt szteroidszintézist zavaró biológiai hatás.

A *Rhodococcus aetherivorans* AK44 és *R. pyridinivorans* CHB15p törzsek együttesen képesek voltak lebontani az *atrazine*-t 7 nap alatt úgy, hogy a végtermékek nem voltak citotoxikusak, illetve nem mutattak ED hatást.

A legjobb, nem toxikus maradékot eredményező *atrazine*-bontó törzsek és keverékek azonban nem voltak képesek az *atrazine*-tól mindössze 1 metil-csoportban különböző *terbuthylazine* lebontására. Egyedül a K404 törzs mutatott 46%-os degradációt, ez esetben viszont a sejttoxikus hatás nem szűnt meg teljes mértékben.

### Új tudományos eredmény

**VI. Tézis (5.1., 5.2.2. és 5.4. fejezetek eredményei alapján):** Az alkalmazott vizsgálatok eredményei alapján a *Rhodococcus pyridinivorans* CHB15p törzs és újonnan leírt *atrazine*-bontó képességű faj, a *Rhodococcus aetherivorans* AK44 törzsének keveréke képes volt olyan anyagokká degradálni az *atrazine*-t, melyek nem citotoxikus hatásúak, illetve nem mutatnak nemi hormon szintézist megzavaró hatást. Az eredmények alapján a xenobiotikumok, így a peszticidek biológiai lebontása során keletkező maradékanyagok komplex biológiai hatásmérése elengedhetetlen.





## 6 KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A baktériumtörzsek és konzorciumok általi biodegradációt vizsgáló kémiai analitikai eredmények alapján megállapítható, hogy **az atrazine kisebb-nagyobb mértékű lebontása széleskörűen megfigyelhető a nemzetségek között, azonban még egy fajon belül is a különböző környezetből izolált törzsek biodegradációs hatékonysága széles skálán mozog.** Vizsgálataimban **a legjobb értékeket a *Rhodococcus* nemzetség tagjai mutatták**, mely nem véletlen: a nemzetség tagjai nagyméretű genommal (9,7 Mbp is lehet) rendelkeznek, mely számos katabolikus enzimet kódoló gént tartalmaznak, valamint több kisebb cirkuláris és nagyobb lineáris plazmiddal is rendelkeznek, melyek szubsztrátjainak palettája rendkívül széles (Larkin et al. 2005). Ezzel együtt **más nemzetségek tagjai is képesek különböző xenobiotikumokat hasznosítani: a *Serratia fonticola* és *Olivibacter oleidegradans* fajokhoz tartozó PT1/1 és TBF2/20.2 törzsek szintén képesek voltak a vegyület jó hatásfokkal történő bontására.** A jó atrazine-bontó baktériumtörzsek főként alifás és aromás szénhidrogénnel szennyezett kárhelyekről lettek izolálva, mely alapján hipotetizálható volt, hogy az atrazine lebontására is képesek lehetnek, azonban egy *Rhodococcus erythropolis* (GD2A) és egy *Cupriavidus basilensis* (OR16) törzs is jó eredményeket mutatott, melyeket nem szennyezett, emberi behatásnak kevésbé kitett talajokból izoláltunk, tehát addig nem szennyezett környezetben élő baktériumok is képesek lehetnek xenobiotikumokat eliminálni. **Az analitikai eredmények alapján továbbá több esetben igazoltam azt a hipotézist, miszerint konzorciumok valóban jobb hatásfokot érhetnek el a szennyezőanyag lebontásában, mint az azokat alkotó törzsek önmagukban.** Az atrazine-t kiváló hatásfokkal bontani képes törzsek és konzorciumok azonban nem voltak képesek a *terbuthylazine* degradációjára (a K404 46%-os, közepes mértékű lebontását kivéve), tehát a két vegyület között a nagy szerkezeti hasonlóság egyáltalán nem jelent garanciát arra, hogy ugyanaz a mikroba mindkettőt ugyanolyan mértékben képes hasznosítani.

A citotoxicitás mérésére használt krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt az atrazine-t és *terbuthylazine*-t tiszta hatóanyagként vizsgálva lényegesen nagyobb érzékenységet mutatott, mint a szabványos akut teszt. Utóbbi esetében meglehetősen nagy az ellentmondás a szakirodalomban található adatok között, míg saját vizsgálataim szerint a két vegyület még magas koncentrációban sem gyakorol gátló hatást 30 perces kontaktidőnél. A krónikus teszt érzékenysége több szempontból is fontos eredmény. Egyrészt segítséget nyújthat a két vegyület ökológiai kockázatának pontosabb felmérésében, hiszen a legtöbb ökotoxikológiai teszt az akut hatásokra fókuszál, azonban egy hosszú kontaktidővel dolgozó vizsgálat a környezeti elemekben gyakran igen kis koncentrációban jelen lévő vegyületek hosszú távú, késleltetett káros hatásait

lehet képes felfedni. Másrésztől bebizonyosodott, hogy a mikrotiter lemezen elvégezhető krónikus teszt egy egyszerű, költség- és időhatékony módszer az *atrazine* és *terbuthylazine* biodegradációjából származó nagyszámú maradékanyag citotoxikus hatásának szimultán vizsgálatára. **Az eredmények alapján megállapítható, hogy a kémiai analitika alapján az anyavegyület koncentrációjának nagymértékű csökkenése nincs minden esetben egyenes arányban a toxicitás csökkenésével/megszűnésével, számos esetben még a 90% feletti biodegradáció mellett is erősen toxikus maradékanyagok keletkeztek.** Továbbá szintén megfigyelhető az a jelenség, ami a biodegradáció során is, azaz ugyanahhoz a fajhoz tartozó törzsek biodetoxifikáló képessége rendkívül eltérő lehet. A törzsek konzorciumban való alkalmazása szintén előnyöket nyújt ezen a téren is: a keverékeket alkotó egyéni törzsekhez képest 4 esetben nemcsak a degradáció mértéke, hanem a detoxifikációs hatékonyság is jelentősen megnőtt, feltehetően valóban az egymással komplementer enzimszisztemeknek köszönhetően.

Az *atrazine* biodetoxifikációjának egyéb aspektusból történő vizsgálatára, azaz a maradékanyagok **indirekt szteroidszintézist zavaró hatásának mérésére sikeresen kifejlesztett kombinált módszerrel végzett kísérleteim azt mutatták, hogy a várható megnövekedett ösztrogén hatás mellett az *atrazine* az androgén hormonok szintézisét is képes lehet indukálni a H295R sejtekben.** Az *atrazine* aromatáz enzim-induktor hatását széleskörűen vizsgálták és igazolták már *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt. Eddigi kutatási eredmények szerint az *atrazine* hatására megemelkedik a plazma ösztrogén-szintje, mely pl. békák esetében a hím egyedek feminizálódásához vezet, valamint az ösztrogén-függő daganatok kialakulásának esélyét is megnöveli. Korábbi *in vivo* kísérletekben a megnövekedett ösztrogén produkcióval párhuzamosan a plazma csökkent tesztoszteron szintjét is megállapították (Friedmann 2002, Hayes et al. 2006, Trentacoste et al. 2001.). A vegyület androgén produkcióra gyakorolt induktív hatása csupán néhány kísérletben jegyzett eddig. Pogrmic-Majkic és mtsai (2010) rövid-távú *atrazine* expozíció hatására patkány Leydig-sejtekben detektált emelkedett androgén-szintet *in vitro* és *in vivo*, ahol úgy találták, hogy a szteroidszintézisben az *atrazine* átmeneti stimuláló hatást gyakorol. Higley és mtsai (2010) H295R sejtvonalat vizsgálva írták le, hogy a sejtekben *atrazine* hatására ösztradiol mellett fokozódik a tesztoszteron termelés is. Az endokrin diszruptor vegyületek szteroidogenezist szabályozó génekre és enzimekre gyakorolt hatása azonban rendkívül összetett és sok esetben egyelőre nem kellően feltérképezett. Az 19 szénatomos adrenális androgén hormonok szintézise a mellékvesekéreg legbelső, *zona reticularis* nevű rétegében történik, ahol főként a CYP17A1 gén terméke, a 17,20-liáz aktivitása révén dehidroepiandroszteron (DHEA), DHEA-szulfát

(DHEA-S) és androszténdion (tesztoszteron és az öszttron prekuzora) szintetizálódik. A H295R sejtvonal különlegessége többek között abban rejlik, hogy egy embrionális sejtvonalról van szó, melyben a mellékvesekéreg zonálisan még differenciálatlan, így a sejtek nem csupán a mellékvesekéregben, hanem a felnőtt emberi gonádokban termelődő hormonokat is képesek szintetizálni. Ennek köszönhetően a sejtvonal a fentiekén túl a DHT kivételével az összes androgén hormon, valamint öszttron és E2 szintézisére is képes, mely unikális *in vitro* módszerre teszi a szteroidogenezis vizsgálatára.

**Az általam mért eredmények alapján tehát feltételezhetően az atrazine az androgén receptorhoz kötődni képes, androgén hatást eredményező hormonok szintézisébe is képes beavatkozni. Ennek/ezeknek a folyamatoknak a molekuláris genetikai hátterét a továbbiakban szükséges kutatni, a H295R sejtek szteroidogén enzimeit kódoló gének expressziójának vizsgálata feltétlenül célszerű lenne.** A jelenleg gyakorlatban alkalmazott módszerek 1-1, konkrétan előre meghatározott végpontot mérésére (pl. tesztoszteron és 17 $\beta$ -ösztradiol) fókuszálnak, ezáltal, amennyiben rossz, vagy nem elegendő végpontot választunk, egyes folyamatok rejtve maradnak. **A kifejlesztett kombinált módszer egyik előnye abban rejlik, hogy összegzett biológiai hatás mérésére alkalmas. Ezáltal segítséget nyújthat a jövőben potenciális ED hatású vegyületek, vagy akár vegyület-keverékek nemi hormon szintézisét megzavaró, összetett hatásának detektálására.** Ezen tulajdonságok megfelelnek az EDSTAC (1998) által az endokrin diszruptorok vizsgálatára ajánlott több lépéses szűrő és vizsgáló stratégia részét képező 1. szint céljainak, mely szerint a vizsgálmódszereknek többek között i.) olcsónak, gyorsan és egyszerűen kivitelezhetőnek; ii.) egyidejűleg több mérési végpontot felölelőnek kell lennie. Továbbá megfelel annak az igénynek is, mely szerint a tesztnek alkalmasnak kell lennie arra, hogy különböző fajokra gyakorolt hatásokat is meg tudjon jósolni, hiszen a szteroidszintézisben szerepet játszó gének és enzimek jelen vannak és azonos biokémiai szerepet töltenek be számos különböző fajban és családban egyaránt.

Az indirekt ED hatást mérő kombinált módszerrel 3 olyan bontási maradékanyagot vizsgáltam, melyek nem voltak citotoxikusak a krónikus AVF tesztben. Ezek eredményei alapján csupán 1 – két *Rhodococcus* fajtól álló – konzorcium esetében volt tapasztalható mind a citotoxikus, mind az ösztrogének és az androgének szintézisére gyakorolt indukáló hatás megszűnése.

Eredményeim rávilágítanak arra, hogy mekkora **jelentősége van egy-egy vegyület analitikával nyomon követett biológiai úton történő lebontása mellett a maradékanyagok komplex, több aspektusból történő biológiai hatásmérésére is**, melyet az *atrazine* esetében sikeresen valósítottam meg a kutatás során és a jövőben célszerűen alkalmazandó módszer együttes lehet nem csupán az *atrazine*, hanem más xenobiotikumok esetében is.

A továbbiakban kiemelt figyelmet kell fordítani a *terbuthylazine* biotransformációjára képes mikrobák keresésére, illetve több, az *atrazine*-t jól bontó törzs vizsgálatára. Valamint a *terbuthylazine*-nal is el kell végezni az indirekt ED hatás vizsgálatokat a kombinált módszerrel, hiszen azon túl, hogy dealkilezett bomlástermékei részben megegyeznek az *atrazine*-ével, melyekről bebizonyosodott, hogy aromataz induktorok, az anyavegyület is rendelkezhet eddig fel nem térképezett hatásokkal. Utóbbi jelentősége abban is rejlik, hogy Európában, illetve azokban az országokban, ahol az *atrazine* használata már tiltott, a gyakorlatban a *terbuthylazine* a helyettesítője. **Figyelembe véve az előbbieket, illetve a *terbuthylazine* krónikus toxicitását és azt a tényt, hogy szinte teljes mértékben ellenállt a vegyület a legjobb *atrazine*-bontó baktériumtörzseknek, reális környezeti kockázattal kell szembenéznünk a jelenlegi nagymértékű *terbuthylazine*-használat miatt.**

A kutatómunka folytatása során figyelmet kell fordítani nem csak a tiszta hatóanyagok, hanem a **formázószerkezetek és készítmények vizsgálatára** is. A formázóanyagok ugyanis önmagukban is ökológiai kockázatot jelenthetnek, a segítségükkel pl. vízoldhatóbbá, biológiailag könnyebben hozzáférhetővé tett hatóanyagok viselkedése, hatása pedig drasztikusan megváltozhat, különbözhet a tiszta hatóanyaghoz képest.

Szükséges továbbá a **különböző környezeti elemekben az eltérő oxigén-ellátottsági és hőmérsékleti viszonyok peszticidek biodegradációjára, illetve a biotransformációjára gyakorolt hatásainak megismerése.** Ehhez munkám folytatásként célszerű lehet mikrokozmosz kísérletek összeállítása, mely során modellezni lehet a szennyező anyagok és a környezeti elemek közötti fizikai, kémiai és biológiai kölcsönhatásokat és ok-okozati összefüggéseket vonhatók le. Ilyen mikrokozmosz kísérletek megfelelő kivitelezéséhez doktori munkám kísérleti eredményei jó kiindulópontként szolgálhatnak.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori kutatásom során első célom volt az *atrazine* és *terbuthylazine* biológiai úton, baktériumok által történő lebontására 15 különböző nemzetséget, illetve 27 fajt képviselő 43 baktériumtörzs biodegradációs képességének vizsgálata. **A törzsek közül összesen 13 volt képes egyénileg az *atrazine* kiindulási koncentrációját több, mint 50%-kal csökkenteni, melyek között domináltak a *Rhodococcus* fajok. A *Rhodococcus aetherivorans*, *R. qingshengii*, valamint a *Serratia fonticola* és *Olivibacter oleidegradans* fajok *atrazine*-degradációs képességet elsőként írtam le.**

A lebontás hatékonyságának növelése érdekében az egyénileg jól bontó törzsekből 21 konzorciumot hoztam létre. A konzorciumok között 9 esetben mutatkozott igen jó, 60-93%-os hatásfokú lebontás, melyek közül **5 esetben az azokat alkotó törzsek egyéni értékeinél nagyobb mértékű degradációra voltak képesek a keverékek.** A *terbuthylazine*-t, noha szerkezetileg csupán egyetlen metil-csoportban különbözik, a leghatékonyabb *atrazine*-bontó törzsek és konzorciumok sem voltak képesek, kivéve a *Rhodococcus pyridinivorans* K404 törzset, mely azonban legjobbként is csupán 46%-os degradációt mutatott.

Az *atrazine* és *terbuthylazine* tiszta hatóanyagok és bontási maradékaik krónikus citotoxikus hatásának vizsgálatára a szabványos *Aliivibrio fischeri* teszt meghosszabbított kontaktidejű (25 óra), mikrotiter lemezen kivitelezhető verzióját használtam. A két herbicid hatóanyag esetében a krónikus teszt lényegesen érzékenyebb ( $EC_{50, atrazine} = 2,67$ , ill.  $8,28$  mg/L,  $EC_{50, terbuthylazine} = 4,97$ , ill.  $9,62$  mg/L 10, ill. 15 óránál), mint a 30 perces akut teszt, ezáltal alkalmas a két vegyület marékanyagainak vizsgálatára, továbbá segíthet a herbicidek ökológiai kockázatának jobb felmérésben. A bontási maradékanyagok citotoxikus hatásának vizsgálati eredményei alapján igazoltam, **hogy az *atrazine* és *terbuthylazine* esetében az analitikai úton kimutatott biodegradációs hatékonysággal nem mindig jár együtt a toxicitás megszűnése.** Több esetben kiváló, akár 90%-ot meghaladó *atrazine*-degradáció is toxikus végterméket eredményezett. Mindössze három egyéni törzs és 4 konzorcium maradékanyaga nem mutatott citotoxikus hatást, utóbbiak pedig degradációs hatásfokban is jobbnak bizonyultak az azokat alkotó egyéni törzsekhez képest. Tehát **céljaimmal összhangban sikeresen hoztam létre egymás enzimmészletét kiegészíteni képes baktériumtörzsekből konzorciumokat, melyek alkalmazásával az *atrazine*-biodetoxifikáció hatásfoka növelhető.** Az egyetlen, 46%-os *terbuthylazine*-bontó törzs végtermékének nem szűnt meg a sejttoxikus hatása. Ez a jelenség a jelenleg *atrazine*-helyettesítőként alkalmazott *terbuthylazine* fokozott ökológiai kockázatára hívja fel a figyelmet.

Az *atrazine*, valamint a bontási maradékai indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálatára a H295R humán adrenokortikális karcinóma sejtvonalat alkalmazó szteroigogenezis *assay* és a *Saccharomyces cerevisiae* alapú, ösztrogén és androgén hatást mérő bioripporter tesztek összekapcsolásával **olyan kombinált módszert fejlesztettem ki, mely alkalmas a nemi hormon szintézist megzavaró összegződő hatások kimutatására. A módszer ezáltal eszköz lehet egyes vegyi anyagok addig nem ismert, indirekt, szteroidogenezist befolyásoló hatásának vizsgálatára konkrét, előre determinált kémiai analitikai végpont nélkül.** A módszert használva kimutattam, hogy az *atrazine* mind az ösztrogének, mind az androgének produkcióját indukálta a humán sejtekben. Három (legjobb bontó 1 egyéni törzs, 2 konzorcium) nem citotoxikus maradékanyagot vizsgálva egyik esetben sem volt ösztrogén hatás mérhető, azonban **mind az ösztrogén, mind az androgén hatást csupán az AK44+CHB15p *R. aetherivorans* és *R. pyridinivorans* konzorcium volt képes megszüntetni.** Kutatásom eredményeképp tehát sikeresen szelektáltam olyan baktérium-konzorciumot, mely képes volt az *atrazine*-t oly módon biodegradálni, hogy a maradékanyag citotoxicitása és endokrin diszruptor hatása is megszűnt. Tekintve, hogy a kémiai analitika (GC-MS) eredményei alapján viszonylag nagyszámú, jól bontó törzs és keverék közül csupán egyetlen konzorcium volt képes az *atrazine* detoxifikációjára, **a degradáció analitikai vizsgálatával párhuzamosan a keletkező bontási maradékanyagok biológiai hatásvizsgálata elengedhetetlen.**

## 8 ENGLISH SUMMARY

The first aim of my research was to investigate the biodegradation of atrazine and terbuthylazine by 43 bacterial strains of 27 different species belonging to fifteen genera. To enhance the effectiveness of biodegradation 21 consortia were created from individual strains with good degradation ability and were tested in biodegradation experiments.

Altogether 13 strains of 43 were able to degrade individually more than 50% of the initial atrazine concentration after 7 days of incubation. Among these strains, members of genus *Rhodococcus* were dominant; however, one strain each of *Cupriavidus basilensis*, *Serratia fonticola* and *Olivibacter oleidegradans* also could be found among them. 9 consortia from 21 showed excellent, 60-93% biodegradation ability, and 5 mixtures were able to degrade atrazine more effectively than the creating individual strains. With one exception, the most efficient atrazine-degrading strains and consortia did not degrade terbuthylazine, although it structurally differs from atrazine only by one methyl group. *Rhodococcus pyridinivorans* K404 strain was able to metabolize no more than 46% of terbuthylazine.

The next aim was to determine whether the cytotoxic and endocrine disrupting effects of the biodegradation end-product are ceased in parallel with degradation. To measure cytotoxicity, chronic *Aliivibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay with prolonged contact time (25 hours) adapted to microplate was used. It appeared to be significantly more sensitive to atrazine and terbuthylazine ( $EC_{50, atrazine} = 2,67$ , and  $8,28$  mg/L,  $EC_{50, terbuthylazine} = 4,97$ , and  $9,62$  mg/L at 10 and 15 hours, respectively) compared to the standard acute (30 min) test, when even at the largest concentrations of atrazine and terbuthylazine (125 and 100 mg/L, respectively) did not result in bioluminescence inhibition. Due to its sensitivity, the chronic assay is suitable to analyze the end-products and could be a valuable tool to provide a more comprehensive view of the ecological risks of atrazine and terbuthylazine. In several cases, the degradation products of sole strains and consortia resulted in significant bioluminescence inhibition. Thus high biodegradation (>90%) does not certainly mean the reduction or cessation of toxicity. Only 3 individual strains and 4 consortia were able to degrade atrazine into non-cytotoxic end-product. Compared to the constituent strain's higher biodegradation capacity along with ceased cytotoxicity was observed in the case of these consortia supporting the theory that complemented enzyme systems of bacteria in mixed cultures are able to improve not only the degradation but also detoxification efficiency. Cytotoxicity of biodegradation end-products of terbuthylazine by *R. pyridinivorans* K404 did not cease in spite of the strain 46% terbuthylazine-degrading ability.

To examine endocrine disrupting effects of atrazine and its end-products formed by bacterial degradation, a combined method was developed using H295R human adrenocortical

carcinoma cell line and *Saccharomyces cerevisiae* BLYES, BLYAS, BLYR bioreporters. The H295R cell line combined with BLYES/BLYAS bioreporter system proved to be useful in identifying the cumulated, indirect disrupting effects on sex steroid synthesis *in vitro* of atrazine and its metabolites, or other chemicals. The method is also applicable in cases when the effect of the test substance(s) on steroid synthesis, hence the analytical endpoints are not possible to pre-specify accurately. According to the results, aside from the expected estrogenic effect, atrazine was able to induce the synthesis of androgen hormones in H295R human adrenocortical cells, as well. Using the combined test, three non-cytotoxic end-products of the most effective atrazine-degrader individual strain and two consortia were examined. Estrogenicity could not be detected in any cases of these samples; however, only one consortium (*R. aetherivorans* AK44 with *R. pyridinivorans* CHB15p) was able to degrade atrazine into non-estrogenic and non-androgenic products.

Considering that the atrazine-bioretification was observed by only one consortium out of the large number of strains and consortia with excellent atrazine-degrading capacity, the importance of complex assessment of biological effects of biodegradation end-products is essential.



## 9 MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

- (http1) <https://cape.ca/wp-content/uploads/2016/05/Atrazine-Bckgd-ENG-2016.pdf>
- (http2) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atrazine#section=Solubility>
- (http3) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22206#section=Solubility>
- (http4) <http://www.weedscience.org/Summary/ResistByActive.aspx>
- (http5) [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-11/documents/howeparegulates\\_mcl\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-11/documents/howeparegulates_mcl_0.pdf)
- (http6) [https://a816-healthpsi.nyc.gov/ll37/pdf/carcclassJuly2004\\_1.pdf](https://a816-healthpsi.nyc.gov/ll37/pdf/carcclassJuly2004_1.pdf)
- (http7) <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/24d-captan/atrazine-ext.html>
- (http8) <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/1751>
- (http9) [https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh\\_terbuthylazine\\_attachment\\_2\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh_terbuthylazine_attachment_2_en.pdf)
- (http10) [https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh\\_terbuthylazine\\_attachment\\_4\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh_terbuthylazine_attachment_4_en.pdf)
- (http11) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYC>
- (http12) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&keywords=tp53>

- Abdel-El-Haleem, D. (2003). Minireview *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*, 2: 71–74.
- Abdel-Razek, A. S., Refaat, B. M., Abdel-Shakour, E. H., Zaher, R., Mohamed, M. K. (2015). Biodegradation of Phenol by *Microbacterium terregenes* Isolated from oil field NORM SOIL. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 3(3): 63-69.
- Abo-Amer, A. (2011). Biodegradation of diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1):71-80.
- Aislabie, J., Bej, A.K., Ryburn, J., Lloyd, N., Wilkins, A. (2005) - Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1): 279-286.
- Alavanja, M.C.R., C. Samanic, M. Dosemeci, J. Lubin, R. Tarone, C.F. Lynch, C. Knott, K. Thomas, J.A. Hoppin, J. Barker, J. Coble, D.P. Sandler, and A. Blain (2003). Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the agricultural health study cohort. *American Journal of Epidemiology*, 157(9): 800–814.
- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179: 1–12.

- APVMA (2004). The reconsideration of approvals of the active constituent atrazine, registrations of products containing atrazine, and their associated labels. Second draft final review report. <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14336-atrazine-second-draft-final-review-report.pdf>
- Arulazhagan, P., Vasudevan, N. (2011). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum sp.* VA1. *Marine Pollution Bulletin* 62(2):388-394
- Azeko, S.T., Odusanya, O.S., Malatesta, K., Anuku, N., Soboyejo, W.O. (2016). Bacterial remediation of polyethylene by *Serratia marcescens subsp. marcescens* and its supernatant. *Advanced Materials Research*, 1132: 238-251
- Babic-Gojmerac, T., Kniewald, Z., Kniewald, J. (1989). Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. *Journal of Steroid Biochemistry* 33(1): 141-146.
- Barra Caracciolo, A., Fajardo, C., Grenni, P., Saccà, M. L., Amalfitano, S., Ciccoli, R., Martin, M. and Gibello, A. (2010). The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 127–136.
- Behki, R. M. (2008). Activation of atrazine metabolism by thiocarbamate herbicides in *Rhodococcus tel*. *Journal of Environmental Science & Health Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 30(2):201-219
- Behki, R. M., & Khan, S. U. (1994). Degradation of Atrazine, Propazine, and Simazine by *Rhodococcus* Strain B-30. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), 1237–1241.
- Bending, G. D., Friloux, M. and Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212: 59–63.
- Bintein, S., Devillers, J., (1996). Evaluating the environmental fate of atrazine in France. *Chemosphere*, 32 (12): 2441–2456 p.
- Bossi, R., Vejrup, K.V., Mogensen, B.B., Asman, W.A. (2002). Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 24; 957(1):27-36.
- Brodkin, M.A., Madhoun, H., Rameswaran, M., Vatnick. I. (2007) - Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(1): 80-84.
- Brun, G.L., MacDonald, R.M., Verge, J., Aubé, J. (2008). Long-term atmospheric deposition of current-use and banned pesticides in Atlantic Canada; 1980-2000. *Chemosphere* 71(2):314-27.
- Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y., & Jiang, S. (2003). Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology*, 36(5): 272–276.
- Cai, S., Cai, T., Liu, S., Yang, Q., He, J., Chen, L., Hu, J. (2014). Biodegradation of N-Methylpyrrolidone by *Paracoccus sp.* NMD-4 and its degradation pathway. *International Biodeterioration & Biodegradation* 93:70-77
- Cantemir, C., Cozmei, C., Scutaru, B., Nicoara, S., Carasevici, E. (1997). p53 protein expression in peripheral lymphocytes from atrazine chronically intoxicated rats. *Toxicology Letters* 93(2-3): 87-94.

- Chandrashekar, M.A., Supreeth, M., Soumya, P. K., Ramesh, N. G., Puttaraju, H.R., Raju, N.S. (2017). Biodegradation of organophosphorous pesticide, chlorpyrifos by soil bacterium – *Bacillus megaterium* RC 88. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences* 19(1):146-152
- Cheng, J.Z. (2007). Biodegradation of Dinitrotoluene by *Pseudoxanthomonas* sp. JA40. <http://www.jyi.org/issue/biodegradation-of-dinitrotoluene-by-pseudoxanthomonas-sp-ja40/>
- Chernyak, S.M., Rice, C.P., McConnell, L.L. (1996) Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering Sea and Chukchi Seas. *Marine Pollution Bulletin*, 32:410–419.
- Chevreuil, M., Garmouma, M., (1993): Occurrence of triazines in the atmospheric fallout on the catchment basin of the River Marne (France). *Chemosphere*, 27(9): 1605–1608 p.
- Choi, E. J., Jin, H. M., Lee, S. H., Math, R. K., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2013). Comparative Genomic Analysis and Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylene (BTEX) Degradation Pathways of *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2):663–671.
- Cook, A.M. (1987). Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiology, Review*, 46: 93–116.
- Cook, A.M. and R. Hutter (1984). Deethylsimazine: Bacterial dechlorination, deamination and complete degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 581–585.
- Cook, A.M. and R. Hutter (1986). Ring dechlorination of deethylsimazine by hydroases from *Rhodococcus corallinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 34: 335–338.
- Cova, D., Nebuloni, C., Arnoldi, A., Bassoli, A., Trevisan, M., Del Re, A. A. M. (1996). N-Nitrosation of Triazines in Human Gastric Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9): 2852–2855.
- Crain, D.A., Guillette Jr., L.J., Rooney, A.A., Pickford, D.B. (1997) - Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental Health Perspectives* 105(5):528-533.
- Darsa, K.V., Joseph, T.A., Ramya, D. (2014). Biodegradation of Petroleum Compound Using the Bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*, 2: 20-25
- Darvas B. & Székács A. (2006). Mezőgazdasági Ökotoxikológia. - L'Harmattan Kiadó, Budapest.
- Das, K., Mukherjee, A.K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7):1339-45
- De Roos, A.J., Zahm, S., Cantor, K., Weisenburger, D., Holmes, F., Burmeister, L., Blair, A. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine* 60(9):e11.
- De Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (1998). The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, 180(7): 1951–1954.
- Eaton, R.W., Karns, J.S. (1991a). Cloning and analysis of s-triazine catabolic genes from *Pseudomonas* spp. strain NRRLB-12227. *Journal of Bacteriology*, 173: 1215–1222.

- Eaton, R.W., Karns, J.S. (1991b). Cloning and comparison of the DNA encoding ammeline aminohydrolase and cyanuric acid amido- hydrolase from three s-triazine-degrading bacterial strains. *Journal of Bacteriology*, 173: 1363–1366
- Efroymsen, R. A., Alexander, M. (1991). Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5): 1441–1447.
- EFSA - European Food Safety Authority (2011). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbuthylazine. *EFSA Journal*, 9(1), 1969.
- Eldridge, M. L., Sanseverino, J., Layton, A. C., Easter, J. P., Schultz, T. W., Sayler, G. S. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19): 6012–6018.
- Eldridge, M. L., Sanseverino J., de Aragao Umbuzeiro G., Gary S. Sayler G. S. (2011). Analysis of Environmental Samples with Yeast-Based Bioluminescent Bioreporters, Environmental Monitoring, Dr Ema Ekundayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-724-6, InTech
- Engel, L.S., D.A. Hill, J.A. Hoppin, J.H. Lubin, C.F. Lynch, J. Peirce, C. Samanic, D.P. Sandler, A. Blair, and M.C. Alavanja (2005). Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 161(2): 121–135.
- Enoch, R.R., Stanko, J.P., Greiner, S.N., Youngblood, G.R., Rayner, J.L., Fenton, S.E. (2007) - Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. *Environmental Health Perspectives* 115(4):541-547.
- Erickson, L.E. Lee, H.K. (1989). Degradation of atrazine and related s-triazines. *Critical Reviews in Environmental Control*, 19: 1–13.
- EU, 1998. A Tanács 98/83/EK irányelve (1998. november 3.) az emberi fogyasztásra szánt víz minőségéről. Hivatalos Lap L330.
- EU, 2004. Bizottsági határozat (2004/248/EK) az atrazinnak a 91/414/EGK tanácsi irányelv I. mellékletébe történőfel nem vételéről, valamint az e hatóanyagot tartalmazó növényvédőszernek engedélyének visszavonásáról. Az Európai Unió Hivatalos Lapja, 43. kötet.
- Ezemonye L.I.N, Tongo I. (2009). Lethal and Sublethal Effects of Atrazine to Amphibian Larvae. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2(1):29-36
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H. (2007) - Atrazine-induced aromatase expression is SF-1- dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives* 115(5):720-727.
- Feakin, S. J., Blackburn, E., & Burns, R. G. (1995). Inoculation of granular activated carbon in a fixed bed with S-triazine-degrading bacteria as a water treatment process. *Water Research*, 29(3), 819–825.
- Ferenczi, Sz., Cserhádi, M., Krifaton, Cs., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Szőke, Zs., Kőszegi, B., Albert, M., Barna, T., Mézes, M., Kovács, K.J., Kriszt, B. (2014). A new ochratoxin A biodegradation strategy using *Cupriavidus basilensis* ÓR16 strain. *PLoS ONE* 9(10): e109817

- Filipov, N.M., Pinchuk, L.M., Boyd, B.L., Crittenden, P.L. (2005) - Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicological Sciences* 86(2):324-332.
- Fingler, S., Mendaš, G., Dvorščak, M., Stipičević, S., Vasilić, Ž., & Drevenkar, V. (2017). Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(12): 11017–11030.
- Fischera, J., Kappelmeyera, U., Kastnera, M., Schauerb, F., Heipieper, J. H. (2010). The degradation of bisphenol A by the newly isolated bacterium *Cupriavidus basilensis* JF1 can be enhanced by biostimulation with phenol. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(4): 324-330
- Forson, D.D., Storfer, A. (2006a). Atrazine increases Ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecological Applications* 16(6):2325-2332.
- Forson, D.D., Storfer, A. (2006b). Effects of atrazine and iridovirus infection on survival and lifehistory traits of the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1):168-173.
- Frank, R. and G.J. Sirons (1985). Dissipation of atrazine residues from soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 541–548.
- Frank, R., Clegg, B.S., Patni, N.K. (1991). Dissipation of atrazine on a clay loam soil, Ontario, Canada, 1986–1990. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 41–50.
- Friedmann, A.S. (2002). Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reproductive Toxicology* 16(3):275-279.
- Froehner, K., Meyer, W., & Grimme, L. H. (2002). Time-dependent toxicity in the long-term inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 46(7): 987–997.
- Frye, R. E., & Rossignol, D. A. (2012). Symptoms associated with autism spectrum disorders. *Pediatric Research*, 69(713): 1–14.
- Gallego, V., Garcia, M. T., Ventosa, A. (2006). *Chryseobacterium hispanicum* sp. nov. isolated from the drinking water distribution system of Sevilla, Spain. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 56(7): 1589–1592
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Rocca, R. V. L. (1990). Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis. *Cancer Research*, 50(17): 5488–5496.
- Getenga, Z., Dörfler, U., Iwobi, A., Schmid, M., Schroll, R. (2009). Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere*, 77(4):534-539.
- Giri, K., Pandey, S., Kumar, R., Rai, J.P. (2016). Biodegradation of isoproturon by *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from herbicide-treated wheat fields of Tarai agro-ecosystem, Pantnagar. *3Biotech*, 6(2):190
- Goolsby, D. A., Battaglin, W. A., (1993). Occurrence, distribution and transport of agricultural chemicals in surface waters of the midwestern United States. In: Goolsby, D. A., Boyer, L. L. Mallard, G. E., (ed.): Selected Papers on Agricultural Chemicals in Water Resources of the Midcontinental United States. *Open File Report*, Denver, 89: 1–25.
- Goolsby, D. A., Battaglin, W. A., Fallon, J. D., Aga, D. S. Kolpin, D. W., Thurman, E. M., (1993). Persistence of herbicides in selected reservoirs in the midwestern United States: Some preliminary results., In: Goolsby, D. A., Boyer, L. L. Mallard, G. E., (ed.): Selected

Papers on Agricultural Chemicals in Water Resources of the Midcontinental United States. *Open File Report*, Denver, 89:51–63.

- Goolsby, D.A., Thurman, E.M., Pomes, M.L., Meyer, M.T., Battaglin, W.A. (1997). Herbicides and their metabolites in rainfall: origin, transport, and deposition patterns across the Midwestern and Northeastern United States, 1990–1991. *Environmental Science and Technology*, 31:1325–1333.
- Greenman, S. B., Rutten, M. J., Fowler, W. M., Scheffler, L., Shortridge, L. a, Brown, B., ... Trunkey, D. D. (1997). Herbicide/pesticide effects on intestinal epithelial growth. *Environmental Research*, 75(1), 85–93.
- Grenni, P., Gibello, A., Barra Caracciolo, A., Fajardo, C., Nande, M., Varga, R., Sacca, M.L., Martínez-Íñigo, M.J., Ciccoli, R., Martín, M. (2009). A new fluorescent oligonucleotide probe for in situ detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. *Water Research*, 43:2999–3008.
- Grenni, P., Rodríguez-Cruz, S. M., Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., Caracciolo, A. B. (2012), Effects of Wood Amendments on the Degradation of Terbutylazine and on Soil Microbial Community Activity in a Clay Loam Soil. – *Water, Air and Soil Pollution*, 223:5401–5412.
- Handa, R. (2014). Terbutylazine - An oral (gavage) study to assess the effects on the hormone-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized female Wistar rats. University of Arizona College of Medicine report number: UA4205870-2(Amendment 1). Unpublished.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10):4612–4617.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., & Vonk, A. (2003). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*, 111(4): 568–575.
- Hayes, T.B, Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2002b). Feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419:895-896.
- Hayes, T.B, Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2002c). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111(4):568-575.
- Hayes, T.B. (2005). Welcome to the revolution: Integrative biology and assessing the impact of endocrine disruptors on environmental and public health. *Journal of Integrative and Comparative Biology* 45(2):321-329.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, 114(1):40–50.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Ali Stuart, A., Vonk, A. (2002a), Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(8):5476-5480.
- Health Canada (1993). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality. Guideline Technical Document. Atrazine. <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health->

[canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-atrazine-eau/alt/water-atrazine-eau-eng.pdf](http://canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-atrazine-eau/alt/water-atrazine-eau-eng.pdf)

- Hecker, M., & Giesy, J. P. (2008). Novel trends in endocrine disruptor testing: The H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1):287–291.
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J. (2004). A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicology Letters* 146(2):183-194.
- Heri, W., Pfister, F., Carroll, B., Parshley, T., Nabors, J.B. (2008). Production, development, and registration of triazine herbicides. In: LeBaron H.M. et al. (eds) *The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. Elsevier
- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R. (2007). Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68:724–730.
- Hugo, C., Segers, P., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kesters, K. (2003). *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy environment. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 53(3): 771–777.
- Jain, R.K., Dreisbach, J.K., Spain, J.C. (1994). Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8):3030-3032
- Jestadi, D. B., Phaniendra, A., Babji, U., Srinu, T., Shanmuganathan, B., & Periyasamy, L. (2014). Effects of short term exposure of atrazine on the liver and kidney of normal and diabetic rats. *Journal of Toxicology*, 2014: ID 536759
- Kahlon, R.S. (2016). Biodegradation and Bioremediation of Organic Chemical Pollutants by *Pseudomonas*. In: Kahlon R. (eds) *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer
- Kämpfer, P., Dreyer, U., Neef, A., Dott, W., Busse, H. J. (2003). *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 53(1): 93–97.
- Károly, G., Ferenczi, M., Györfi, L., Marth, P., Lehoczky, É., (1999). A talajvédelmi információs rendszer keretében végzett növényvédőszer-analitikai vizsgálatok eredményei. *Növényvédelem*, 35: 189- 194 p.
- Kárpáti, Z., Györfi, L., Csanádi, M., Károly, G., Krómer, I. (1998). Ivóvizek növényvédőszer szennyezettsége. *Egészségtudomány* 42:143-152
- Karrow, N.A., MacCay, J.A., Brown, R.D., Musgrove D.L., Guo, T.L., Germolec, D.R., White Jr., K.L. (2005). Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. *Toxicology* 209(1):15-28.
- Keller, J., McClellan-Green, P. (2004). Effects of organochlorine compounds on cytochrome P450 aromatase activity in an immortal sea turtle cell line. *Marine Environmental Research* 58(2-5):347-351.
- Kidd, H., James D. R., (1991). *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK,
- Kiesecker, J.M. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(15):9900–9904.

- Kılıç, N.K. (2009). Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum* sp. isolated from industrial wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(6):778-781
- Kjeldsen, L.S., Ghisari, M., Bonfeld-Jørgensen, E.C. (2013). Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272:453-464
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., & Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 112(5):524-531.
- Kolpin, D., Barbash, J., Gilliom, R. (1998). Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assessment Program. *Environmental Science and Technology*, 32:558-566.
- Korpraditskul, R., Katayama, A., & Kuwatsuka, S. (1993). Degradation of Atrazine by Soil Bacteria in the Stationary Phase. *Journal of Pesticide Science*, 18: 293-298.
- Köck, M., Farré, M., Martínez, E., et al (2010). Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology*, 383:73-82.
- Kruger, E.L., Somasundaram, L., Kanwar, R.S., Coats, J.R. (1993). Movement and degradation of [<sup>14</sup>C]atrazine in undisturbed soil columns. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1969-1975.
- Kumar, R., Singh, B., Gupta, V.K. (2012). Biodegradation of fipronil by *Paracoccus* sp. in different types of soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(5):781-787.
- Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B. (2010) Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments. In: Alvarez H.M. (ed) Biology of Rhodococcus. *Springer*
- Laird D.A., Koskinen W.C. (2008). Triazine soil interactions. In: LeBaron H.M. et al. (eds) The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture. *Elsevier*
- LAWA – Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (2004). Bericht zur Grundwasserbeschaffenheit – Pflanzenschutzmittel. ISBN: 3-88961-247-4. [http://www.lawa.de/documents/Bericht\\_Grundwasserbeschaffenheit\\_Pflanzenschutzmittel\\_2004\\_fle.pdf](http://www.lawa.de/documents/Bericht_Grundwasserbeschaffenheit_Pflanzenschutzmittel_2004_fle.pdf)
- Li, Y., Kawamura, K., Fujiwara, N., Naka, T., Liu, H., Huang, X., Kobayasi, K., Ezaki, T. (2003). *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (4) 523-528
- Lim, S., Ahn, S.Y., Song, I.C., Chung, M.H., Jang, H.C., Park, K.S., Lee, K.U., Pak, Y.K., Lee, H.K. (2009). Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *PloS One*, 4(4):e5186
- Lin Q., Donghui W., Jianlong W. (2010). Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon. *Bioresource Technology*, 101(14):52229-5234
- Liskova, A., Wagnerova, J., Tulinska, J., (2000). Effect of the herbicide atrazine on some immune parameters in mice. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 18 (2): 235-240
- Liu, Z., S.A. Clay, D.E. Clay, and S.S. Harper (1995). Ammonia fertilizer influences atrazine adsorption-desorption characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 815-819.



- Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Riva, M. C., González, S., & Cortina, J. L. (2012). Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination. *Science of the Total Environment*, 440:307–313.
- Ma, L., Selim, H.M. (1996). Atrazine retention and transport in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 145:129-73.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003). Brock Biology of Microorganisms, Tenth Edition. Upper Saddle River. New Jersey: Pearson Education, Inc., USA, 1019 p.
- Maghsoudi, E., Fortin, N., Greer, C., Maynard, C., Pagé, A., Duy, S.V., Sauvé, S., Prévost, M., Dorner S. (2016). Cyanotoxin degradation activity and mlr gene expression profiles of a *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Champlain, Canada. *Environmental Science. Processes & Impacts* 18(11):1417-1426
- Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., & Allan, D. L. (1993). Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6): 1695–1701.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., Wackett, L. P. (1995). Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4):1451-1457.
- Mandelbaum, R.T., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. (2008). Microbial degradation of s-triazine herbicides. In: LeBaron H.M. et al. (eds) The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture. *Elsevier*
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R., Sadowsky, M.J. (2001). Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 183(19):5684-5697.
- Meng, X., Niu, G., Yang, W., Cao, X. (2015). Di(2-ethylhexyl) phthalate biodegradation and denitrification by a *Pseudoxanthomonas* sp. strain. *Bioresource Technology* 180:356-359
- Mersie, W., J. Liu, C. Seybold, Tierney, D. (1998). Extractability and degradation of atrazine in a submerged sediment. *Weed Science*, 46: 480–486.
- Mladinic, M., Zeljezic, D., Shaposhnikov, S. A., & Collins, A. R. (2012). The use of FISH-comet to detect c-Myc and TP 53 damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicology Letters*, 211(1):62–69.
- Moore, A., Waring, C.P. (1998). Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62(1):41-50.
- Mukred, A.M., Hamid A.A, Hamzah, A., Yusoff W.M.W. (2008). Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum–oil in contaminated water. *Journal of Biological Sciences*, 8(4):73-79
- Mulani, N., Fulke, A.B., DeSouza, E.; Ram, A., Maloo, A., Sayed, F., Gajbhiye, S.N. (2017). Biodegradation of crude oil using marine *Bacillus* species from Vadinar coast, Gujarat, India. *Current Science*, 112(3):569-576
- Nadalian, B., Moghadam, M.S., Ebrahimipour G. (2016). Biodegradation of malathion by *Serratia marcescens* isolated from Arvandkenar region, Iran. *Advances in Environmental Technology*, 2(1):55-61.
- Navarro, S., Vela, N., Gimenez, M.J., Navarro, G. (2004). Persistence of four s-triazine herbicides in river, sea and groundwater samples exposed to sunlight and darkness under laboratory conditions. *Science of The Total Environment*, 329:87–97

- NÉBIH (2015). 2014. évi szerforgalmi jelentés. [https://www.nebih.gov.hu/data/cms/174/992/2014.evi\\_Szerforgalom.pdf](https://www.nebih.gov.hu/data/cms/174/992/2014.evi_Szerforgalom.pdf)
- Neerja, J.G., Bhattacharya, A., Kumar, S., Singh, D.K., Khare, S.K. (2016). Biodegradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by using *Serratia marcescens* NCIM 2919. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(12): 809-816.
- Nisha, K.N., Devi, V., Varalakshmi, P., Ashokkumar, B. (2015). Biodegradation and utilization of dimethylformamide by biofilm forming *Paracoccus* sp. strains MKU1 and MKU2. *Bioresource Technology*, 188:9-13
- Nisha, P., Eldho, P. G., Prakash, P. (2016). Biodegradation of Carbofuran using bacteria from pretreated plantain field. *Journal of Experimental Biology*, 6(2):30-35
- Nödler, K, Licha, T, Voutsas, D (2013) Twenty years later - Atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 70:112–118.
- O’Loughlin, E.J., Sims, G.K., Traina, S.J. (1991). Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment. *Biodegradation*, 10(2):93-104
- OECD (1997) Glossary of Environment Statistics, Studies in Methods, Series F, No. 67, United Nations, New York
- Ostrofsky, E. B., Robinson, J. B., Traina, S. J., & Tuovinen, O. H. (2002). Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(10):1449–1459.
- Palma, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., et al (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81:485–489.
- Pandey, G., Paul, D. and Jain, R. K. (2003). Branching of *o*-nitrobenzoate degradation pathway in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100: identification of new intermediates. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 231–236.
- Pasquarelli, F., Spera, A., Cantarella, L., Cantarella, M. (2015). Biodegradation of bromoxynil using the cascade enzymatic system nitrile hydratase/amidase from *Microbacterium imperiale* CBS 498-74. Comparison between free enzymes and resting cell. *RSC Advances*, 5:36913-36923
- Pawar, K.R., Mali, G.V. (2014). Biodegradation of the organophosphorus insecticide dichlorvos by *Bacillus* species isolated from grape wine yard soils from sangli district, M.S., India. *International Research Journal of Environment Sciences*, 3(5):8-12
- Peng, H., Yin, H., Deng, J., Ye, J-S., Chen, S-N., He, B-Y., Zhang, N. (2012). Biodegradation of Benzo[*a*]pyrene by *Arthrobacter oxydans* B4. *Pedosphere*, 22(4):554-561
- Peng, X., Zhang, J.S., Li, Y.Y., Li, W., Xu, G.M., Yan, Y.C. (2008). Biodegradation of insecticide carbofuran by *Paracoccus* sp. YM3. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(7):588-94.
- Perei, K., Pernyeszi, T., Lakatos, Gy. (2012). Bioremediáció. [www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011\\_0025.../2011\\_0025\\_kor\\_4.pdf](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011_0025.../2011_0025_kor_4.pdf)
- Pethő, Á., Szentey, L., Baranyai, T., (2011): A hazánkban használt gyomirtó szer hatóanyagok felülvizsgálata (2004-2010) a felhasználás szemszögéből. *Agrofórum Extra*, 40: 5-10 p.

- Piccolo, A., G. Celano, and C. DeSimone (1992). Interactions of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolysed products. *Science of the Total Environment*, 117/118: 403–412.
- Pintér, A., Török, G., Börzsönyi, M., Surján, A., Csik, M., Kelecsényi, Z., Kocsis Z., (1990). Long-term carcinogenicity bioassay of the herbicide atrazine in F344 rats. *Neoplasma* 37 (5): 533-544.
- Pinto, A.P., Caldeira, A.T., Martin Teixeira, D., Mestrinho, E., Dordio, A.V., Do Carmo Romerías, M. (2011). Degradation of terbuthylazine, diflufenican and pendimethalin pesticides by *Lentinula edodes* cultures. European Biotechnology Congress, 2011. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (Suppl. 1):S70
- Pinto, A.P., Serrano, C., Pire, T., Mestrinho, E., Dias, L., Martins Teixeira, D., Caldeira, A.T. (2012). Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of The Total Environment*, 435-436:402-410
- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., ... Martin-Laurent, F. (2003). Isolation and characterisation of *Nocardioide* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters*, 221(1), 111–117.
- Porter, W.P., Jaeger, J.W., Carlson, I.H. (1999). Endocrine, immune, and behavioral effects of aldicarb (carbamate), atrazine (triazine) and nitrate fertilizer mixtures at groundwater concentrations. *Toxicology and Industrial Health*, 15:133-150.
- Powell, E.R., Faldladdin, N., Rand, A.D., Pelzer, D., Schrunck, E.M., Dhanwada, K.R. (2011). Atrazin exposure leads to altered growth of HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25:644-651
- Pruett, S.B., Fan, R., Zheng, Q., Myers, L.P., Hebert, P. (2003). Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: Characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol. *Toxicological Sciences*, 75(2):343-354.
- Qin, W., Zhu, Y., Fan, F., Wang, Y., Liu, X., Ding, A., Dou, J.(2017). Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 121:131–138.
- Qu, Y., Shen, E., Ma, Q., Zhang, Z., Liu, Z., Shen, W., Wang, J., Li, D., Li, H., Zhou, J. (2015). Biodegradation of indole by a newly isolated *Cupriavidus* sp. SHE. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 34:126-132
- Rainey, W., Bird, I., Mason, J. (1994). The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100(1–2), 45–50.
- Ratna, K. A., Jeevan, G., Ashok, M., Koteswara, R. Ch., Vamsi, K. S. K. (2012). Malathion degradation by *Bacillus* spp. isolated from soil. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(4): 37-42
- Rayner, J.L., Enoch, R.R., Fenton, S.E. (2005). Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicological Sciences*, 87(1): 255-266.
- Rayner, J.L., Enoch, R.R., Wolf, D.C., Fenton, S.E. (2007). Atrazine-induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long-Evans rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3):238-248.
- Ricken, B., Fellmann, O., Kohler, H.P., Schäffer, A., Corvini, P.F., Kolvenbach, B.A. (2015). Degradation of sulfonamide antibiotics by *Microbacterium* sp. strain BR1 - elucidating the downstream pathway. *New Biotechnology*, 32(6):710-715

- Roberge, M., Hakk, H., Larsen, G. (2004). Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicology Letters*, 154(1-2):61-68.
- Rohr, J.R., Schotthoefer, A.M., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Halstead, N., Hoverman, J.T., Johnson, C.M., Johnson, L.B., Lieske, C., Piwoni, M.D., Schoff, P.K., Beasley, B.L. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455:1235-12399.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., & Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 211-222.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Lagacherie, B., Piutti, S., Andreux, F., Soulas, G. (2003). Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere*, 51(7):569-576.
- Rowe, A. M., Brundage, K. M., & Barnett, J. B. (2007). In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(2):179-188.
- Rowe, A.M., Brundage, K.M., Schafer, R., Barnett, J.B. (2006). Immunomodulatory effects of maternal atrazine exposure on male Balb/c mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 214(1):69-77.
- Rusiecki, J.A., A. De Roos, W.J. Lee, M. Dosemeci, H. Lubin, J.A. Hoppin, A. Blair, and M.C.R. Alavanja (2004). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the Agricultural Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(18): 1375-1382.
- Sagarkar, S., Gandhi, D., Devi, S. S., Sakharkar, A., & Kapley, A. (2016). Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(2): 200-207.
- Salam, L., Obayori, O., Campbell, C., Ilori, M. Amund, O. (2017). Pyrene biodegradation potentials of an actinomycete, *Microbacterium esteraromaticum* isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 6:995-1000.
- Salam, L.B., Obayori, O.S., Olatoye, N.O. (2014). Biodegradation of anthracene by a novel actinomycete, *Microbacterium sp.* isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30:335-341
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W., van der Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1):44-54.
- Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P., van den Berg M. (2001). Effects of Chloro-s-Triazine Herbicides and Metabolites on Aromatase Activity in Various Human Cell Lines and on Vitellogenin Production in Male Carp Hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 109(10):1027-1031.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., van der Berg, M. (2000). 2-chloro-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity? *Toxicology Sciences*, 54(1):121-127.
- Sanseverino, J., Eldridge, M.L., Layton, A.C., Easter, J.P., Yarbrough, J., Schultz, T.W., Sayler, G.S., (2008). Screening of Potentially Hormonally Active Chemicals Using Bioluminescent Yeast Bioreporters. *Toxicological Sciences*, 107:122-134.

- Sanseverino, J., Gupta, R.K., Layton, A.C., Patterson, S.S., Ripp, S., Saidak, L., Simpson, M.L., Schultz, T.W., Sayler, G.S., (2005). Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. *Applied Environmental Microbiology*, 71:4455-4460.
- Sanusi, A., Millet, M., Mirabe, P., Wortham, H. (2000). Comparison of atmospheric pesticide concentrations measured at three sampling sites: local, regional and long-range transport. *Science of the Total Environment*, 263(1-3):263-77.
- Sass, J.B., Colangelo, A. (2006). European union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 12(3):260–267.
- Shao, Z. Q., Behki, R. (1996). Characterization of the expression of the thcB gene, coding for a pesticide-degrading cytochrome P-450 in *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):403–407.
- Shelton, D. R., Khader, S., Karns, J. S., & Pogell, B. M. (1996). Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation*, 7(2):129–36.
- Shen, F. T., Lu, H. L., Lin, J. L., Huang, W. S., Arun, A. B., Young, C. C. (2006). Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the gyrB gene. *Research in Microbiology*, 157:367-375.
- Shiomi, N., Ako, M. (2012). Biodegradation of melamine and cyanuric acid by a newly-isolated *Microbacterium* strain. *Advances in Microbiology*, 2:303-309
- Shokrollahzadeh, S., Azizmohseni, F., Golmohamad, F. (2015). Characterization and Kinetic Study of PAH–Degrading *Sphingopyxis ummariensis* Bacteria Isolated from a Petrochemical Wastewater Treatment Plant. *Advances in Environmental Technology*, 1(1):1-9
- Siddiqui, M. F., Elwell, C., & Johnson, M. H. (2016). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders. *Autism-Open Access*, 6(5):190
- Silva, J. A., Tobella, L. M., Becerra, J., Godoy, F., Martinez, M. A. (2007). Biosynthesis of polybeta-hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(6):542-6.
- Silva, V. P., Moreira-Santos, M., Mateus, C., Teixeira, T., Ribeiro, R., & Viegas, C. A. (2015). evaluation of *Arthrobacter aurescens* strain TC1 as bioaugmentation bacterium in soils contaminated with the herbicidal substance terbuthylazine. *PLOS ONE*, 10(12): e0144978.
- Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(4), 537–577.
- Smith, D., Alvey, S., & Crowley, D. E. (2005). Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(2):265–273.
- Soltanian, S. (2016). Effect of atrazine on immunocompetence of red-eared slider turtle(*Trachemys scripta*). *Journal of Immunotoxicology*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1195463>
- Spano, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N., Silvestre, F., Thome, J.P., Kestemont, P. (2004). Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 66(4):369-379.

- Stamper, D. M., Radosevich, M., Hallberg, K. B., Traina, S. J., & Tuovinen, O. H. (2002). *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(12): 1089–1098.
- Stevens, J. T., Sumner, D. D. (1991): Herbicides. In: Hayes, W. J., Laws, E. R., (ed.), Handbook of Pesticides Toxicology, Academic Press, New York
- Stoker, T.E., Laws, S.C., Guidici, D.L., Cooper, R.L. (2000). The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: An evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicological Sciences* 58(1):50-59.
- Strong, L. C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2002). *Arthrobacter aurescens* TC1 Metabolizes Diverse s-Triazine Ring Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5973–5980.
- Struthers, J. K., Jayachandran, K., & Moorman, T. B. (1998). Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9):3368–75.
- Stump, (2014). Terbutylazine -A Study of the effects of 4 days of exposure on the estrogen-induced luteinizing hormone (LH) surge in ovariectomized Sprague Dawley rats. WIL Research report number: WIL-639222. Unpublished.
- Subba, R.G. V., Rafi, M. Md., Rubesh, K. S., Khayaletu, N., Muralidhara, Rao D., Manjunatha, B., Philip, G. H., Reddy, B. R. (2016). Optimization study of 2-hydroxyquinoxaline (2-HQ) biodegradation by *Ochrobactrum* sp. HQ1. *3Biotech*, 6:51
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., & Zhai, Q. (2007). SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metabolism*, 6(4):307–319.
- Suzawa, M., Ingraham, H. A. (2008). The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS ONE*, 3(5):1–18.
- Szabó, I., Szoboszlay, S., Kriszt, B., Háhn, J., Harkai, P., Baka, E., Tánicsics A., Kaszab E., Privler Z., Kukolya, J. (2011). *Olivibacter oleidegradans* sp. nov., a hydrocarbon degrading bacterium isolated from a biofilter cleanup facility on a hydrocarbon-contaminated site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12):2861–2865.
- Székács, A., Mörtl, M., & Darvas, B. (2015). Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: Surveys in 1990-2015. *Journal of Chemistry*, ID717948
- Talwar, M.P., Mulla, S.I., Ninnekar, H.Z. (2014). Biodegradation of organophosphate pesticide quinalphos by *Ochrobactrum* sp. strain HZM. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5):1283-1292
- Talwar, M.P., Ninnekar, H.Z. (2015). Biodegradation of pesticide profenofos by the free and immobilized cells of *Pseudoxanthomonas suwonensis* strain HNM. *Journal of Basic Microbiology*, 55(9):1094-1103
- Tappe, W., Groeneweg, J., & Jantsch, B. (2002). Diffuse atrazine pollution in German aquifers. *Biodegradation*, 13(1):3–10.
- Tappe, W., Herbst, M., Hofmann, D., Koepchen, S., Kummer, S., Thiele, B., Groeneweg, J. (2013). Degradation of Sulfadiazine by *Microbacterium lacus* Strain SDZm4, Isolated from Lysimeters Previously Manured with Slurry from Sulfadiazine-Medicated Pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8):2572-2577

- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. (2002). Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3):527-531.
- Taxvig, C., Hadrup, N., Boberg, J., Axelstad, M., Bossi, R., Bonfeld-Jørgensen, E. C., Vinggaard, A. M. (2013). In vitro - in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(3): 757–766.
- Tchounwoul, P.B., Wilson, B., Ishaque, A., et al. (2000). Toxicity assessment of atrazine and related triazine compounds in the Microtox Assay, and computational modeling for their structure-activity relationship. *International Journal of Molecular Sciences*, 1:63–74.
- Teng, Y., Wang, X., Zhu, Z., Chen, W., Christie, P., Li, Z., Luo, Y. (2017). Biodegradation of pentachloronitrobenzene by *Cupriavidus* sp. YNS-85 and its potential for remediation of contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10):9538-9547
- Thamer, M. , Al-Kubaisi, A. , Zahraw, Z. , Abdullah, H. , Hindy, I. and Khadium, A. (2013). Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq. *Natural Science*, 5: 865-873.
- Thelin, G.P., and Stone, W.W. (2010) Method for estimating annual atrazine use for counties in the conterminous United States, 1992–2007: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2010–5034, 129 p.
- Thurman, E. M., Goolsby, D. A., Meyer, M. T., Kolpin, D. W., (1991). Herbicides in surface waters of the midwestern United States: The effect of spring flush. *Environmental Science and Technology*, 25(10): 1794–1796 p.
- Thurman, E. M., Kolpin, D. W., Goolsby, D. A., Meyer, M. T., (1998). Source and transport of desethylatrazine and deisopropylatrazine to ground water of the midwestern United States. In: BALLANTINE, L.G., MCFARLAND, J.E., HACKETT, D.S., (ed.), Triazine Herbicides: Risk Assessment, ACS Symposium, Washington DC, 480 p. 189–207 p.
- Thurman, E.M., Cromwell, A.E. (2000). Atmospheric transport, deposition, and fate of triazine herbicides and their metabolites in pristine areas at Isle Royale National Park. *Environmental Science and Technology*, 34(15):3079-3085.
- Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Meyer, M.T., Mills, M.S., Pomes, M.L., Kolpin, D.W. (1992). A reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface water of the midwestern United States using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 26(12):2440-2447.
- Tierney, D.; Christensen, B.; Mattan, C. (1998). Human Exposure to Atrazine and Simazine via Ground and Surface Drinking Water: Update IV: Supplement to EPA MRID No. 44597601: Cumulative Community Water Systems (CWS) Population and Exposure Distributions: Lab Project Number: 00300: 696-95. Unpublished study prepared by En. Fate, LLC. 969 p.
- Tiwari, J., Naoghare, P., Sivanesan, S., Bafana, A. (2017). Biodegradation and detoxification of chloronitroaromatic pollutant by *Cupriavidus*. *Bioresource Technology*, 223:184-191
- Tomlin, C., (2000): Atrazine. In: Thornton Heath (ed.): The Pesticide Manual. 12th British Crop Protection.
- Topp, E., Zhu, H., Nour, S. M., Houot, S., Lewis, M., & Cuppels, D. (2000). Characterization of an Atrazine-Degrading Pseudomonas sp. Isolated from Canadian and French Agricultural Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7):2773–2782.
- Towner, K. (2006). The Genus *Acinetobacter*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (Eds.). The Prokaryotes. ISBN 978-0-387-30746-6

- Trebst, A. (2008) The mode of action of triazine herbicides in plants. In: LeBaron H.M. et al. (eds) *The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. Elsevier
- Trentacoste, S.V., Friedman, A.S., Youker, R.T., Breckenridge, C.B., Zirkin, B.R. (2001). Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *Journal of Andrology*, 22(1):142-148
- Turnbull, G. A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., & Morgan, J. A. W. (2001). Degradation of Substituted Phenylurea Herbicides by *Arthrobacter globiformis* Strain D47 and Characterization of a Plasmid-Associated Hydrolase Gene, *puhA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5):2270–2275.
- UK (1996a) Rapporteur Monograph. (October). Council Directive 91/414/EEC Regulation 3600/92. Atrazine, Vol. 1. Report and Proposed Decision of the United Kingdom made to the European Commission under Article 7(1) of Regulation 3600/92.
- UK (1996b) Rapporteur Monograph (October). Council Directive 91/414/EEC Regulation 3600/92. Atrazine, Vol. 3. Annex B to the Report and Proposed Decision of the United Kingdom made to the European Commission under Article 7(1) of Regulation 3600/92. Summary, Scientific Evaluation, and Assessment.
- UK Rapporteur Monograph (2000). Council Directive 91/414/EEC, Regulation 3600/92. Atrazine. Volume 3, Annex B. Addendum to the report and proposed decision of the United Kingdom made to the European Commission under Article 7(1) of Regulation 3600/92; Summary, Scientific Evaluation and Assessment. February.
- US EPA (1994). Atrazine, simazine, and cyanazine: Notice of initiation of special review. *Federal Register*, 59(225): 60412–60443.
- US EPA (1995): Reregistration Eligibility Decision (RED) Terbutylazine - Prevention, Pesticides And Toxic Substances. (7508W) EPA 738-R-95-005, 1995. March.
- US EPA (2000). Cancer Assessment Review Committee, Atrazine: Evaluation of Carcinogenic Potential. December 13, 2000. HED Doc. No. 014431.
- US EPA Revised Atrazine Interim Reregistration Eligibility Decision (IRED) (2003). Docket ID Number OPP-2003-0367.
- US EPA (2004). Pesticides Industry Sales and Usage. 2000 and 2001 Market Estimates. Biological and Economic Analysis Division, Office of Pesticide Program, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. US Environmental Protection Agency Washington, DC 20460.
- US EPA (2006a). Memorandum. Atrazine: Finalization of Interim Reregistration Eligibility Decision and Completion of Tolerance. Reassessment and Reregistration Eligibility Process. US Environmental Protection Agency Washington, DC 20460.
- US EPA (2006b). Reregistration Eligibility Decision for Simazine.
- US EPA (2006c). Triazine Cumulative Risk Assessment.
- US EPA (2011). Steroidogenesis (Human Cell Line – H295R) OCSPP Guideline 890.1550. Standard Evaluation Procedure (SEP). Endocrine Disruptor Screening Program
- US EPA (2017). Pesticides Industry Sales and Usage. 2008-2012 Market Estimates. Biological and Economic Analysis Division, Office of Pesticide Program, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. US Environmental Protection Agency Washington, DC 20460. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf)

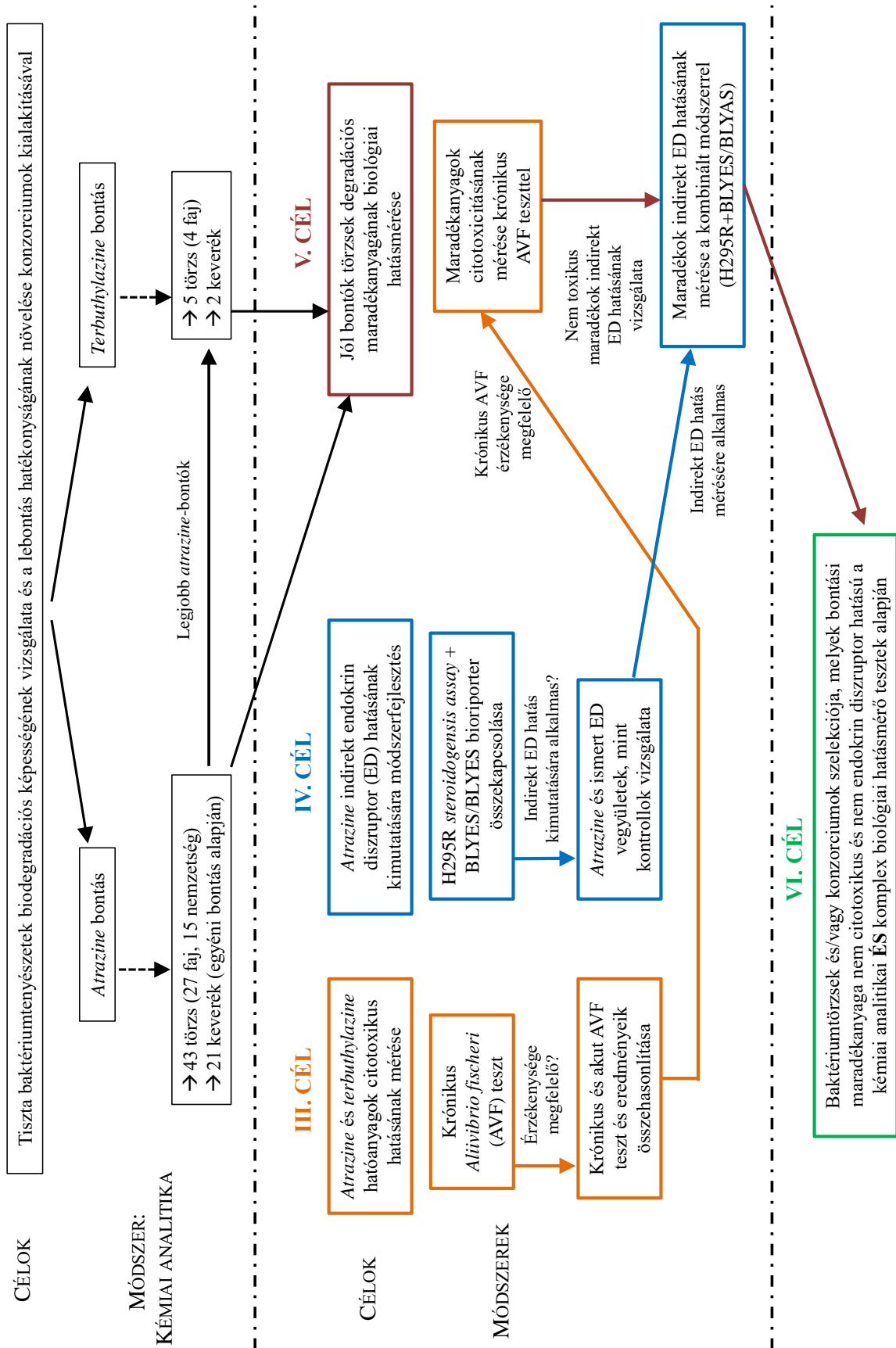


- Vaishampayan, P. A., Kanekar, P. P., & Dhakephalkar, P. K. (2007). Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(4):273–278.
- Vandamme, P., Bernadet, J. F., Segers, P., Kersters K., Holmes, B. (1994): New perspectives in the classification of the Flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *International Journal of Systemic Bacteriology*. 44 (4) 827–831. p
- Villa, S., Migliorati, S., Monti, G. S., & Vighi, M. (2012). Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck) II: Response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86:93–100.
- Vinggaard, A.M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H.R., Bonefeld-Jorgensen, E., Christiansen, S., Laier, P. & Poulsen, M.E. (2006). Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *International Journal of Andrology* 29(1): 186-92.
- Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Pütz, T., Herbst, M., Vereecken, H. (2014). 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Research*, 50:294-306
- Wang, G., Bi, M., Liang, B., Jiang, J., Li, S. (2011). *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. Nov., a DDT-Degrading Bacterium Isolated from a Long-Term DDT-Polluted Soil. *Current Microbiology*, 62(6):1760-1766
- Wang, G., Chen, X., Yue, W., Zhang, H., Li, F., Xiong, M. (2013a). Microbial degradation of acetamiprid by *Ochrobactrum* sp. D-12 Isolated from Contaminated Soil. *PLoS ONE*, 8(12): e82603.
- Wang, G., Zhao, Y., Gao, H., Yue, W., Xiong, M., Li, F., Zhang, H., Ge W. (2013b). Co-metabolic biodegradation of acetamiprid by *Pseudoxanthomonas* sp. AAP-7 isolated from a long-term acetamiprid-polluted soil. *Bioresource Technology*, 150:259-265
- Wang, Y., Wang, C., Li, A. and Gao, J. (2015). Biodegradation of pentachloronitrobenzene by *Arthrobacter nicotianae* DH19. *Letters in Applied Microbiology*, 61: 403–410.
- Wetzel, L.T., Luempert, L.G., Breckenridge, C.B., Tisdell, M.O., Stevens, J.T., Thakur, A.K., Extrom, P.J., Eldridge, J.C. (1994). Chronic effects of atrazine on estrus and mammary gland formation in female Sprague-Dawley and Fischer-344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43(2):169-182.
- WHO (1998). Atrazine in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *Health Criteria and Other Supporting Information*, 2, 1–5.
- WHO (2007). Chemical Safety of Drinking-water: Assessing priorities for risk management. WHO Press, Geneva
- WHO-IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1999). Vol. 73: Some chemicals that cause tumors of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. Atrazine. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(1):29–44.
- Wu, X., Wang, W., Liu, J., Pan, D., Tu, X., Lv, P., Wang, Y., Cao, H., Wang, Y., Hua, R. (2017). Rapid biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18):3711-3720

- Xie, S., Wan, R., Wang, Z., Wang, Q. (2013). Atrazine biodegradation by *Arthrobacter* strain DAT1: effect of glucose supplementation and change of the soil microbial community. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(6):4078-84.
- Yamada, T., Takahama, Y., Yamada, Y. (2008). Biodegradation of 2,4,6-tribromophenol by *Ochrobactrum* sp. strain TB01. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5):1264-1271
- Yanze-Kontchou, C., & Gschwind, N. (1994). Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12):4297-4302.
- Yu, X.M., Yu, T., Yi, G.H., Dong, Q.L., An, M., Wang, H.R., Ai, C.X. (2015). Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genetics and Molecular Research*, 14(4):14717-14730
- Zhang, R. L., Huang, G. Q., Lian J. Y., Li, X. G. (2007). Degradation of MTBE and TEA by a new isolate from MTBE-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 19(9): 1120-1124.
- Zhang, Y., Jiang, Z., Cao, B., Hu, M., Wang, Z.G., Dong, X.N. (2011a). Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(8):1140-1144.
- Zhang, J., Zheng, J.-W., Liang, B., Wang, C.-H., Cai, S., Ni, Y.-Y., He, J., Li S.-P. (2011b). Biodegradation of chloroacetamide herbicides by *Paracoccus* sp. FLY-8 in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9):4614-4621
- Zhang, Y., Cao, B., Jiang, Z., Dong, X., Hu, M., & Wang, Z. (2012a). Metabolic ability and individual characteristics of an atrazine-degrading consortium DNC5. *Journal of Hazardous Materials*, 237-238:376-381.
- Zhang, H., Mu, W., Hou, Z., Wu, X., Zhao, W., Zhang, X., Pan, H., Znag, S. (2012b). Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural wastes*, 47(3):153-160.

**M2. A kutatómunka során megfogalmazott célok és az azok megvalósításához alkalmazott módszerek folyamatábrája.**

**I. ÉS II. CÉL**



**M3. *Saccharomyces cerevisiae* (BLYES, BLYAS, BLYR) tápoldatának összetétele**

YMM (500 ml-re számolva)	
I. oldat (MM Medium)	427,25 ml
II. oldat (glükóz)	50 ml
III. oldat (L-aszparaginsav)	12,5 ml
IV. oldat (L-treonin)	4 ml
V. oldat (CuSO <sub>4</sub> )	1,25 ml
VI. oldat (vitamin)	5 ml

I. MM Medium	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,61 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,98 g
KOH	4,2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	1 ml (40 mg/50 ml H <sub>2</sub> O)
L-hisztidin	50 mg
Adenin	50 mg
L-arginin-HCl	20 mg
L-metionin	20 mg
L-tirozin	30 mg
L-izoleucin	30 mg
L-lizin-HCl	30 mg
L-fenilalanin	25 mg
L-glutaminsav	100 mg
L-valin	150 mg
L-szerin	375 mg
Desztillált víz	1000 ml

II. Glükóz oldat	
D-Glükóz	20 g
Desztillált víz	80 ml

III. Aszparaginsav oldat	
L-aszparaginsav	200 mg
Desztillált víz	50 ml

IV. L-treonin oldat	
L-treonin	240 mg
Desztillált víz	10 ml

V. CuSO <sub>4</sub> oldat	
CuSO <sub>4</sub>	374,5 mg
Desztillált víz	50 ml

VI. Vitamin oldat	
Tiamin	4 mg
Piridoxin	4 mg
Pantoténsav	4 mg
Inozitol	20 mg
Biotin	10 mg
Desztillált víz	100 ml

## M4. Atrazine akut Microtox teszt jegyzőkönyv

### MicrotoxOmni Test Report

Date: 2016.09.01. 09:34 AM

Test Protocol: International Standard ISO 11348-3

Sample: atrazin 250ppm (2)

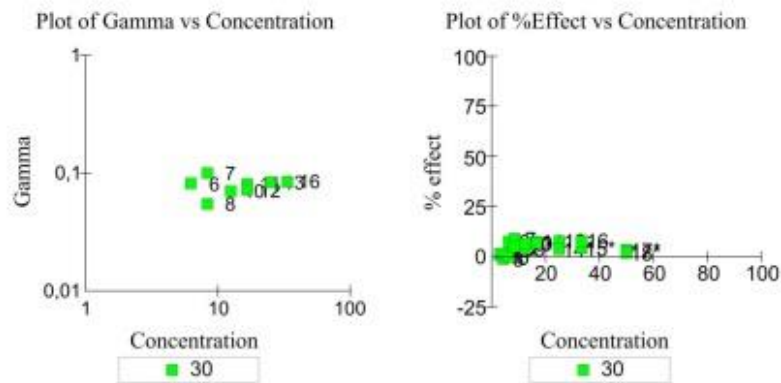
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: -

Test name: atrazin 250ppm (2)

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\PESTICID.mdb



30 Mins Data:

Conc	G	Io	IC30	I30	H30	Mean H30
3.000	32	93,03	80.0	80,09	0.000	
3.000	32	87,69	76.0	75,03	1.00	1,11 ± 0,30
4.000	24	84,51	73.0	74,17	-1.00	
4.000	24	90,61	78.0	77,30	1.00	0,29 ± 1,41
6.000	16	84,27	73.0	73,26	0.000	
6.000	16	89,62	77.0	71,90	7.00	3,69 ± 3,86
8.000	12	90,60	78.0	71,49	9.00	
8.000	12	86,20	74.0	70,93	5.00	7,13 ± 1,95
12.00	8	90,44	78.0	75,26	4.00	
12.00	8	90,95	78.0	73,74	6.00	5,35 ± 1,23
16.00	6	86,06	74.0	69,11	7.00	
16.00	6	89,56	77.0	72,50	6.00	7,10 ± 0,37
25.00	4	86,89	75.0	69,60	7.00	
25.00	4	86,07	74.0	71,82	3.00	5,78 ± 1,93
33.00	3	88,28	76.0	73,36	4.00	
33.00	3	88,69	76.0	70,96	7.00	6,03 ± 1,78
50.00	2	90,03	78.0	75,40	3.00	
50.00	2	89,25	77.0	75,91	1.00	2,75 ± 0,75

# - used in calculation; \* - invalid data; D - deleted from calcs.

Statistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.

GL <= 2 . Please test the sample in higher concentrations

Control (G2) I30/I0: 82,97/95,78 = 0,8663; 79,47/91,4 = 0,8695 fk=0,8679

## M5. Terbutylazine akut Microtox jegyzőkönyv

### MicrotoxOmni Test Report

Date: 2015.03.25. 04:50 PM

Test Protocol: DIN-type Test

Sample: TBA-200ppm\_1.

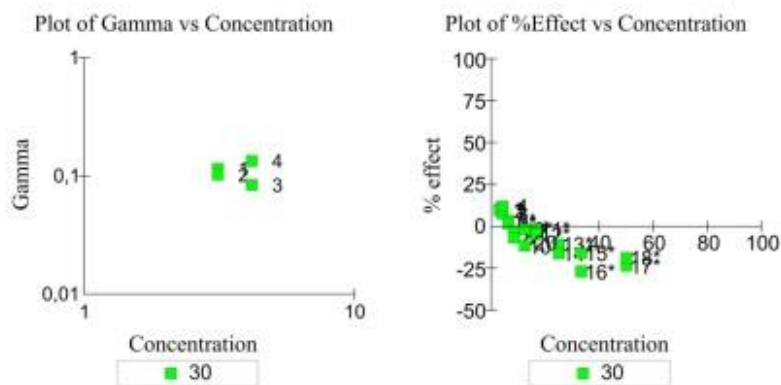
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: -

Test name: TBA-200ppm\_1.

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\PESTICID.mdb



30 Mins Data:

Conc	G	Io	IC30	I30	H30	Mean H30
3.000	32	96,76	64,0	57,97	10,0	
3.000	32	88,79	59,0	53,80	9,00	9,81 ± 0,51
4.000	24	76,76	51,0	47,31	7,00	
4.000	24	67,24	44,0	39,60	11,0	9,80 ± 2,05
6.000	16	73,26	48,0	47,28	3,00	
6.000	16	79,08	52,0	51,87	1,00	2,61 ± 0,79
8.000	12	73,13	48,0	50,29	-2,00	
8.000	12	61,71	41,0	43,98	-6,00	-4,81 ± 1,87
12.00	8	85,13	56,0	57,90	-1,00	
12.00	8	82,05	54,0	61,15	-11,0	-6,68 ± 4,88
16.00	6	96,32	64,0	65,36	-1,00	
16.00	6	89,49	59,0	62,67	-4,00	-3,20 ± 1,63
25.00	4	76,53	51,0	56,64	-10,0	
25.00	4	80,74	53,0	62,70	-16,0	-13,51 ± 2,73
33.00	3	79,49	53,0	61,60	-15,0	
33.00	3	72,21	48,0	61,22	-26,0	-21,45 ± 5,45
50.00	2	88,32	59,0	72,84	-23,0	
50.00	2	74,91	50,0	59,44	-18,0	-21,11 ± 2,34

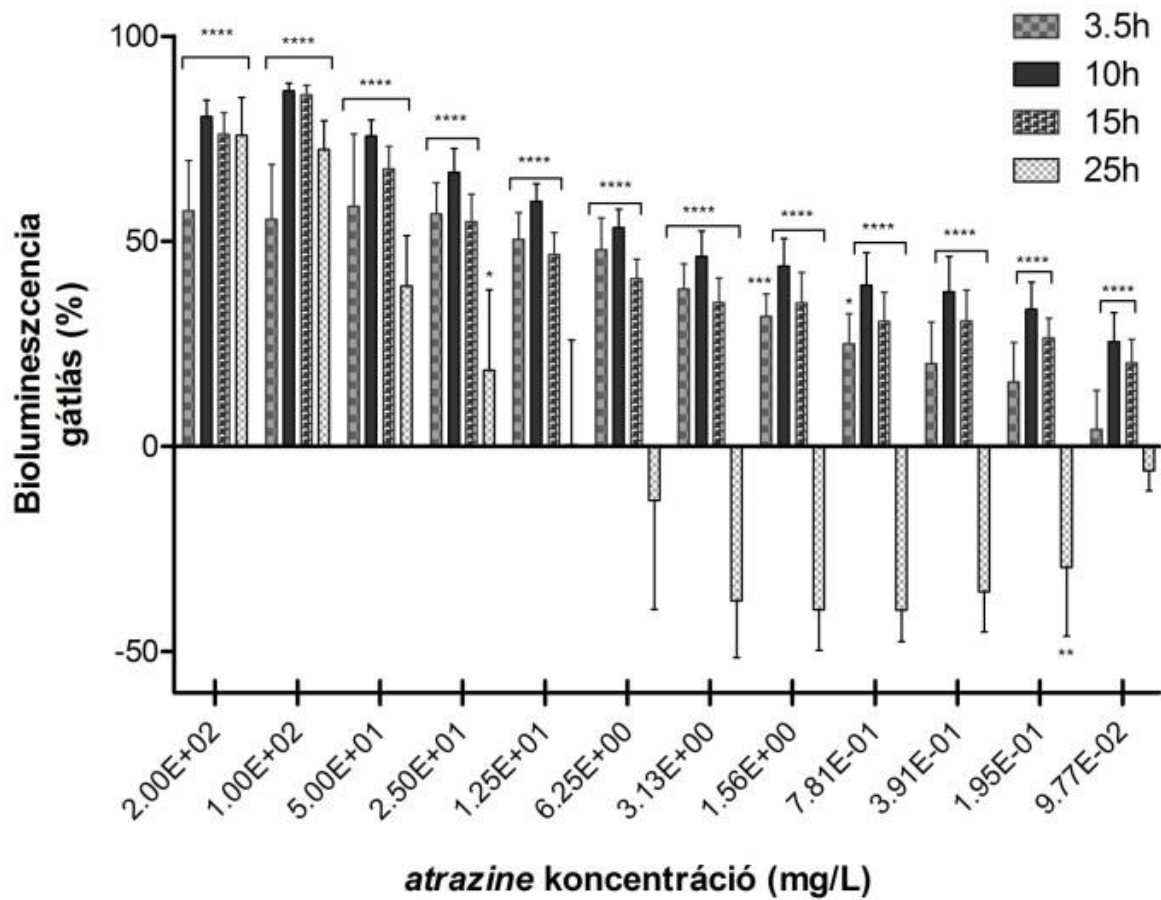
# - used in calculation; \* - invalid data; D - deleted from calcs.

Statistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.

GL <= 2 . Please test the sample in higher concentrations

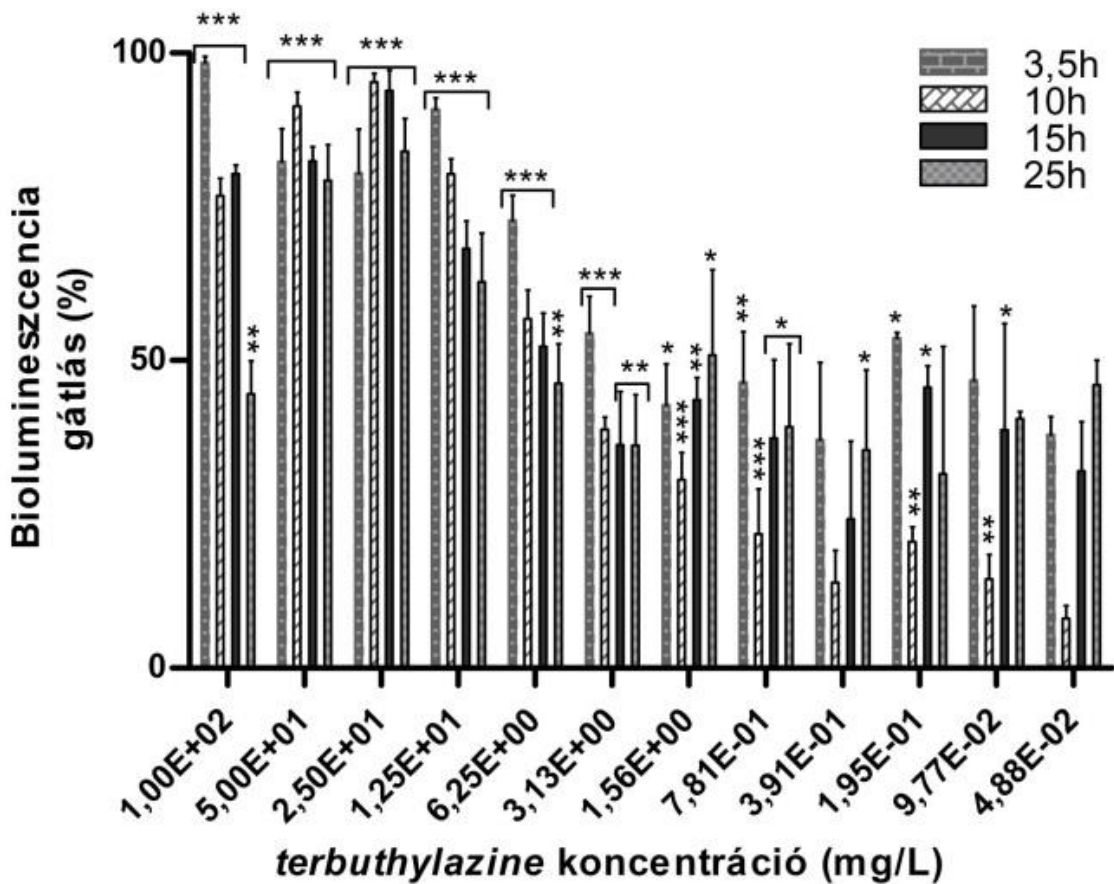
Control (G2) I30/I0: 64,62/100 = 0,6462; 69,81/101,18 = 0,6900 fk=0,6681

**M6. *A. fischeri* biolumineszcencia gátlás *atrazine* hatására krónikus testben**



Biolumineszcencia gátlás (%) értékek az *atrazine* expozíció hatására a meghosszabbított kontaktidejű, krónikus *Aliivibrio fischeri* testben az oldószeres kontroll fénykibocsátás értékeihez viszonyítva. A kontrolltól való szignifikáns eltérés megállapítása egyutas ANOVA és Dunnett *post hoc* teszttel történt. A feltüntetett adatok az átlag  $\pm$  SD értékek. (\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.05$ ); (\*\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.002$ ); (\*\*\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.0002$ ); (\*\*\*\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.0001$ )

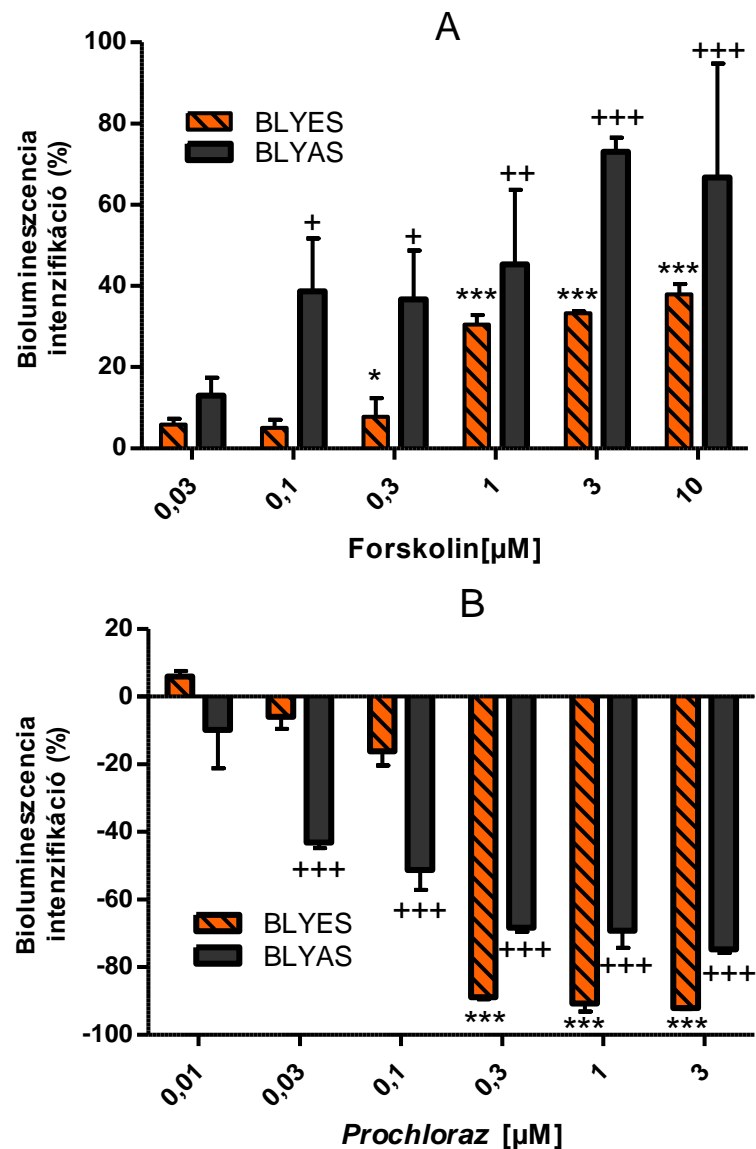
**M7. *A. fischeri* biolumineszcencia gátlás *terbuthylazine* hatására krónikus tesztben**



Biolumineszcencia gátlás (%) értékek a *terbuthylazine* expozíció hatására a meghosszabbított kontaktidejű, krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben az oldószeres kontroll fénykibocsátás értékeihez viszonyítva. A kontrolltól való szignifikáns eltérés megállapítása egyutas ANOVA és Dunnett post hoc teszttel történt. A feltüntetett adatok az átlag  $\pm$  SD értékek. (\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.05$ ); (\*\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.002$ ); (\*\*\*) szignifikáns eltérés az oldószeres kontrolltól ( $p < 0.0002$ )

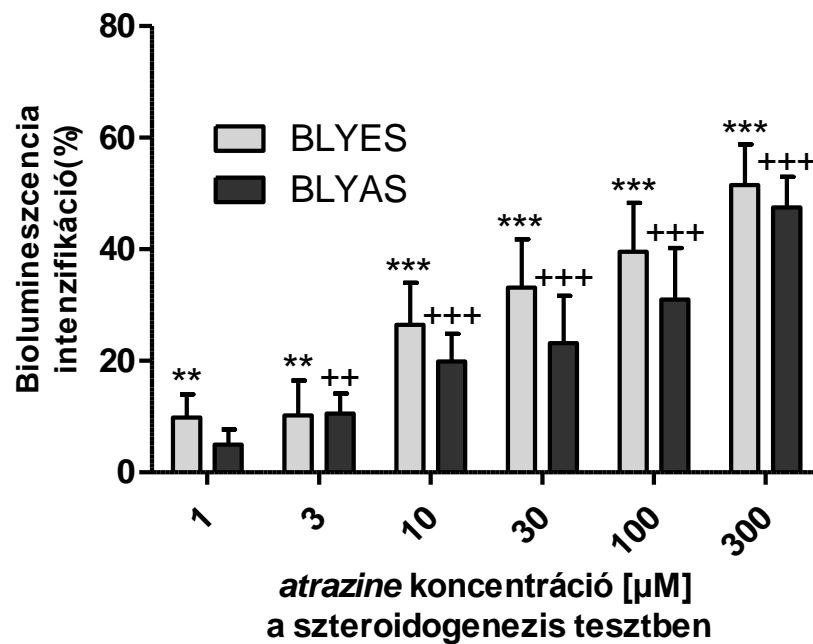


**M8. Forskolin és *prochloraz* hatására emelkedett és csökkent ösztrogén és androgénhatás kimutatása élesztő teszttel biolumineszcencia intenzifikációban kifejezve.**



A szteroidogenezis tesztben 48 órás forskolin (A) és *prochloraz* (B) expozíció után a H295R sejtek felülúszói által kiváltott megemelkedett, illetve lecsökkent ösztrogén- és androgén hatás következtében kiváltott biolumineszcencia intenzifikációs %-ok a BLYES és BLYAS tesztekben. Szignifikancia megállapítása egyutas ANOVA és Tukey post hoc teszttel történt. (\*,+) szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest ( $p < 0,05$ ); (\*\*,++) szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*,+++) szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest ( $p < 0,001$ ).

**M9.** *Atrazine* hatására emelkedett ösztrogén és androgénhatás kimutatása élesztő tesztrel biolumineszcencia intenzifikációban kifejezve.



A szteroidogenezis tesztben 48 órás *atrazine* expozíció után a H295R sejtek felülúszói által kiváltott megemelkedett ösztrogén- és androgén hatás következtében kiváltott biolumineszcencia intenzifikációs %-ok a BLYES és BLYAS tesztekben. Szignifikancia megállapítása egyutas ANOVA és Tukey post hoc teszttel történt. (\*\*,++) szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*,+++) szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest ( $p < 0,001$ ).

## 10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori munkám elvégzéséhez nyújtott segítségéért, szakmai-tudományos tanácsaiért, irányító véleményeiért és támogatásáért köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szoboszlai Sándornak.

Köszönöm az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet vezetőjének, Dr. Kriszt Baláznak a szakmai és tudományos lehetőségeket, melyek révén kutatómunkám megvalósulhatott.

Köszönöm a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék, valamint a Regionális Egyetemi Tudásközpont egykori és jelenlegi munkatársainak az évek során nyújtott segítségüket, barátságukat és támogatásukat. Külön köszönöm Benséné Fekete Ildikónak végtelen segítőkészségét és azt az elképesztő mennyiségű laboratóriumi háttérmunkát, mely nélkül kutatómunkámat nem tudtam volna elvégezni.

Köszönettel tartozom Kovács J. Krisztinának és Ferenczi Szilaméznak, az MTA-KOKI munkatársainak a humán sejtvonallal végzett kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségükért, tanácsaikért, illetve a közös gondolkodásba fektetett idejükért és energiájukért.

Volt és jelenlegi hallgatóimnak köszönöm segítségüket, mellyel hozzájárultak a kutatáshoz.

Köszönöm páromnak és kedves barátaimnak, hogy az évek során minden körülmények között mellettem álltak és támogattak.

Hálásan köszönök minden családomnak, testvéremnek és szüleimnek, akik őszinte és feltétel nélküli szeretetére, tanácsaikra, támaszokra mindig, minden esetben számíthatok.

Köszönöm Édesapámnak, hogy már kisgyermek koromban megismertette és megszerettette velem a természettudományokat, beszélgetéseinket mindig boldogan idézem vissza. Dolgozatomat az Ő emlékének ajánlom.

Köszönetemet fejezem ki a kutatómunkámat támogató projekteknek:

- GINOP 2.3.2.-15-2016-00004: A balatoni horgászati célú halgazdálkodás fenntarthatóvá tételének megalapozása.
- NVKP\_16-1-2016-0023: Új kockázatkezelési modellrendszer fejlesztése a víz- és élelmiszerbiztonság növelése érdekében a haltermékvonalon