

SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***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. Szoboszlai Sándor, PhD
egyetemi docens
Szent István Egyetem,
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

.....
az iskolavezető jóváhagyása

.....
a témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

| | | |
|------|---|----|
| 1. | A téma aktualitása, jelentősége | 4 |
| 2. | Célkitűzések, előzmények | 5 |
| 3. | Anyag és módszer | 7 |
| 3.1. | Bontási kísérletek | 7 |
| 3.2. | <i>Atrazine</i> és <i>terbutylazine</i> citotoxicitásának mérése <i>Aliivibrio fischeri</i> teszttel..... | 7 |
| 3.3. | Módszerfejlesztés indirekt endokrin diszruptor hatás kimutatására..... | 8 |
| 3.4. | <i>Atrazine</i> bontási maradékanyagok indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálata | 9 |
| 3.5. | Adatok értékelése | 9 |
| 4. | Eredmények és értékelésük | 10 |
| 4.1. | Bontási kísérletek eredményei..... | 10 |
| 4.2. | <i>Aliivibrio fischeri</i> citotoxicitási tesztek | 11 |
| | <i>A tiszta hatóanyagok citotoxicitás-mérésének eredményei</i> | 11 |
| | <i>A bontási maradékanyagok citotoxicitás-mérésének eredményei</i> .. | 12 |
| 4.3. | Módszerfejlesztés az <i>atrazine</i> indirekt endokrin diszruptor hatásának mérésére..... | 13 |
| 4.4. | <i>Atrazine</i> biodegradációból származó maradékanyagok indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálata..... | 15 |
| 5. | Következtetések, javaslatok | 17 |
| 6. | A témával kapcsolatos megjelent publikációk listája | 21 |

1. A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE

Az elmúlt fél évszázadban az emberi populáció duplájára növekedett, melyhez hasonló ütemben emelkedett a globális mezőgazdasági termelés mértéke, ezzel párhuzamosan pedig a peszticidek felhasználása is. Haszonnövényeink és állataink védelmére használt vegyszeres kezelések során azonban a hatóanyagok egy része nem ér célba, a környezeti elemekbe jutva nem célszervezetekre és környezetre gyakorolt komplex káros hatásai rendkívül szerteágazók.

Az *atrazine* és *terbuthylazine* hatóanyagok a szimmetrikus-triazinok családjába tartozó, PSII fotorendszert gátló hatású herbicidek. Az *atrazine* vízszennyező tulajdonságáról, immun- és hormonmoduláns hatásáról igen kiterjedt szakirodalom áll rendelkezésre, azonban az EU-n kívül számos országban alkalmazzák jelenleg is. Noha féléletideje optimális környezeti feltételek mellett néhány hét és 1-2 év között mozog, reduktív körülmények között becsapdázódva évtizedekig is perzisztál; hazánkban 10 évvel betiltása után is az egyik leggyakrabban kimutatott felszín alatti növényvédő szer maradék. A *terbuthylazine* legújabb kutatások szerint az *atrazine*-hoz hasonló endokrin diszruptor (ED) hatást képes gyakorolni, lebomlása, talajban való viselkedése az *atrazine*-éhoz hasonló, az EU országaiban jelenleg *atrazine*-helyettesítőként alkalmazzák főként kukorica gyomirtására. Bomlástermékeik között szintén található toxikus, hormonmoduláns anyagok.

Más szennyezőanyaghoz hasonlóan ezen hatóanyagok környezeti elemekből történő eliminálására is a bioremediáció a leginkább környezetkímélő megoldás. Noha az *atrazine* biodegradációja évtizedek óta kutatott és szakirodalma igen kiterjedt (a *terbuthylazine*-é kevésbé), a vizsgálatok csupán a kiindulási vegyületek mennyiségi csökkenésére fókuszálnak, a keletkező maradékanyagok biológiai hatásainak mérésére nem.

2. CÉLKITŰZÉSEK, ELŐZMÉNYEK

Doktori kutatási munkám során céljaim a következők voltak:

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

II. A biodegradáció hatékonyságának növelése bakteriális konzorciumok alkalmazásával.

III. A tiszta hatóanyagok és bontási maradékok hosszú távú expozíció során kiváltott sejtoxikus 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 biodetoxifikációjának 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.

Első és második célkitűzésem megvalósításához olyan baktériumtörzseket választottam ki, melyek döntő többségükben szennyezett környezeti elemekből (talaj, talajvíz, komposztok), illetve néhány esetben bolygatatlan talajmintákból lettek izolálva, továbbá korábbi kísérletek eredményei szerint jó hatékonysággal képesek egyes szénhidrogének és mikotoxinok lebontására. Az *atrazine* esetében a kémiai analitikai mérések alapján egyénileg jó bontást mutató törzsekből konzorciumokat alkottam annak érdekében, hogy a bontás hatékonyságát az egyes törzsek egymást kiegészítő enzimrendszere segítségével növelni tudjam. Az *atrazine*-t kiváló

hatékonysággal bontani képes törzsek és keverékek *terbuthylazine* bontó képességét ezt követően vizsgáltam.

A biodetoxifikáció nyomon követéséhez (V. célkitűzés) a harmadik és negyedik célkitűzés megvalósítására volt szükség. Ezek során először az *Aliivibrio fischeri* (AVF) biolumineszcencia gátlási toxicitási teszt szabványos akut és meghosszabbított kontaktidejű krónikus verziójának érzékenységet hasonlítottam össze a két herbicid hatóanyagra nézve. Miután meggyőződtem a krónikus teszt megfelelő érzékenységről, a későbbiekben a bontási maradékanyagok citotoxicitásának vizsgálatához alkalmaztam. A maradékok indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálatához módszerfejlesztést kívántam végrehajtani, mellyel nem csupán egy-egy, előre jól definiált kémiai-, vagy immunanalitikai végpont, hanem a nemi hormonok szintézisét megzavaró összegződő biológiai hatás mérhető. A cél az volt, hogy kifejlesztett kombinált módszerrel, miután az *atrazine*-t, illetve ismert szteroidszintézist megzavaró hatású anyagokat teszteltem, a nem citotoxikus *atrazine*-maradékokat is megvizsgáljam. A krónikus AVF és indirekt ED hatást mérő kombinált tesztet alkalmazva a maradékanyagok komplex biológiai hatásmérésén keresztül végcélom az volt, hogy olyan baktériumtörzseket és/vagy keverékeket szelektáljak, melyek a dolgozat vizsgálati tárgyát képező növényvédő szer hatóanyagokat káros hatásokkal nem rendelkező maradékanyagokká képesek bontani.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Bontási kísérletek

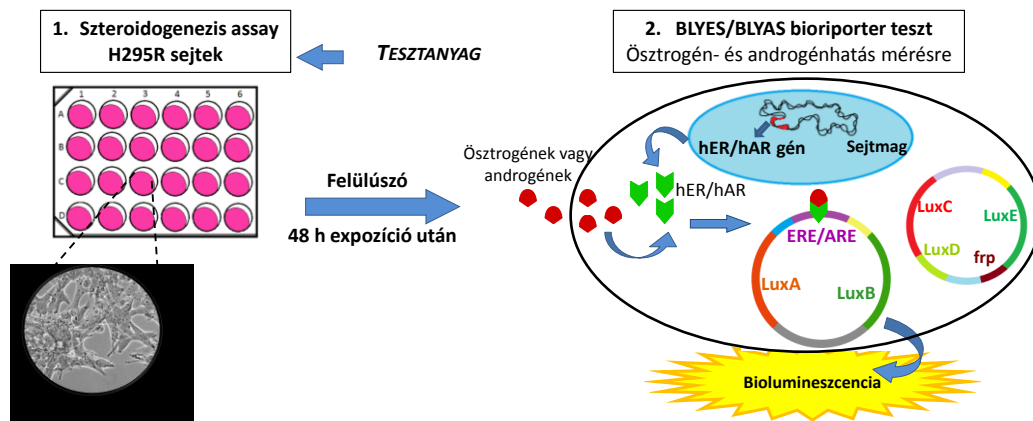
Az *atrazine* esetében összesen 15 baktériumnemzetség 27 különböző fajához tartozó 43 törzs egyéni degradációs képességét vizsgáltam, majd az 50%-os egyéni degradációt mutató törzsekből összesen 21 keveréket hoztam létre. A legjobb *atrazine*-bontók közül 5 törzs és két konzorcium *terbuthylazine*-bontását vizsgáltam. A törzsekből egységes denzitású ($OD_{600}=0,6$) 72 órás inokulumokat hoztam létre, melyeket vagy önmagukban, vagy más törzssel 1:1 arányban keverve vizsgáltam 50 mg/L koncentrációjú herbicid hatóanyag lebontására. A bontási kísérlet végén (7 nap rázatásos inkubáció, 28 °C), a biodetoxifikációs vizsgálatokra történő mintázás után, a sejtes állományt is tartalmazó folyadékok maradék növényvédő szer tartalma kémiai analitikai (GC-MS, Wessling Hungary Kft.) módszerrel lett megállapítva. A törzsek és keverékek bontási képességét a kontroll mintához viszonyítva százalékosan fejeztem ki.

3.2. *Atrazine* és *terbuthylazine* citotoxicitásának mérése *Aliivibrio fischeri* teszttel

Az *atrazine* és *terbuthylazine* tiszta hatóanyagok és bontási maradékaik krónikus citotoxikus hatásának vizsgálatára a szabványos *Aliivibrio fischeri* (DSM 7151) szervezetet alkalmazó teszt meghosszabbított kontaktidejű (25 óra), mikrotiter lemezen kivitelezhető verzióját használtam. A krónikus teszt érzékenységét a szabványos (ISO 11348-1) akut, 30 perces kontaktidejű teszt eredményeivel vettem össze. Miután meggyőződtem a megfelelő érzékenységről, a bontási maradékanyagok citotoxicitásának mérését a krónikus *A. fischeri* teszttel végeztem el.

3.3. Módszerfejlesztés indirekt endokrin diszruptor hatás kimutatására

Az *atrazine*, valamint a bontási maradékai indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálatára a H295R humán adrenokortikális karcinóma sejtvonalat alkalmazó *steroidogenesis assay*-t és a *Saccharomyces cerevisiae* alapú, ösztrogén és androgén hatást mérő BLYES és BLYAS bioripporter teszteket kapcsoltam össze, utóbbiak olyan genetikailag módosított organizmusok, amik ösztrogén- ill. androgénreceptorhoz kötődni képes anyagok hatására biolumineszkálnak. A *steroidogenesis assay*-t az OCSP 890.1150 (ES EPA 2011) Guideline alapján végeztük. A tesztanyagokkal exponált sejtek felülűszoinak ösztrogén és androgén hatását az élesztő alapú bioripporter teszttel mértem. A teszt kialakítása során az *atrazine* tiszta hatóanyag mellett pozitív kontrollként az ismert sztereoidszintézist megzavaró hatású forskolint és *prochloraz*-t használtam a *steroidogenesis assay*-ben. A BLYES és BLYAS tesztekben 17β -ösztradiol és 5α -dihidrotesztoszteron volt a pozitív kontroll, a citotoxicitás mérésére a konstitutív BLYR törzset használtam, melynek fénykibocsátása toxikus anyag hatására csökken. A kombinált módszert sematikus az 1. ábra mutatja be.



1. ábra – Indirekt, nemi hormon szintézist megzavaró komplex hatás kimutatására kifejlesztett kombinált módszer sematikus ábrája.

3.4. *Atrazine* bontási maradékanyagok indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálata

A sikeresen kialakított, kombinált módszerrel 3 olyan *atrazine*-bontásból származó maradékanyagot vizsgáltam, melyek a krónikus AVF teszt eredményei alapján nem voltak citotoxikus hatásúak, valamint kiváló degradációs százalékot mutattak. A maradékok közül kettő keverékek maradékanyaga, egy pedig egyéni bontásból származó minta volt. A szűrt mintákkal exponáltuk a humán sejteket, majd a felülúszókat a BLYES és BLYAS teszttel vizsgáltam.

3.5. Adatok értékelése

A biolumineszcencia értékek statisztikai kiértékelését a GraphPad Prism 5 szoftverrel (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) végeztem el. Szignifikancia vizsgálatra egy-utas ANOVA tesztet használtam Tukey, ill. Dunnett post hoc teszttel. Az EC_{50} értékeket normalizált koncentráció-válasz görbékből generáltam nem-lineáris regressziós modellel. A biolumineszcencia gátlási és intenzifikációs értékek kiszámításakor a minták fénykibocsátás értékeinek kontrolltól való százalékos csökkenését, ill. növekedését számoltam.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Bontási kísérletek eredményei

A kémiai analitikával nyomon követett bontási kísérlet eredményei alapján a 43 baktériumtörzsből és 21 konzorciumból összesen 13 egyéni törzs és 9 keverék volt képes a kiindulási *atrazine*-t 50-98%-ban lebontani. Az erre vonatkozó részletes eredményeket az 1. táblázat foglalja össze. A törzsek közül két *Rhodococcus* faj (*R. aetherivorans* és *R. qingshengii*), valamint az *Olivibacter oleidegradans* és *Serratia fonticola* fajok *atrazine*-bontó képességéről eddig nem számolt be a szakirodalom.

1. táblázat – Baktériumtörzsek és törzskeverékek *atrazine*-bontási képessége 7 napos ráztatás után a kontroll minta értékéhez viszonyítva %-osan kifejezve.

| Törzs jele | Faj | <i>Atrazine</i> biodegradáció 7 nap után (% a kontroll mintához viszonyítva) | Törzsek jele | <i>Atrazine</i> biodegradáció 7 nap után (% a kontroll mintához viszonyítva) |
|------------|-----------------------------------|--|-------------------------|--|
| PT1/1 | <i>Serratia fonticola</i> | 51,66±1,00 | N11+TBF2/20.2 | 63,64±1,18 |
| N11 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 52,98±1,51 | AK44 + CHB15P+TBF2/20.2 | 78,34±1,39 |
| OR16 | <i>Cupriavidus basilensis</i> | 53,13±3,66 | PT2/14B+TBF2/20.2 | 80,12±9,67 |
| AK44 | <i>Rhodococcus aetherivorans</i> | 59,07±3,58 | AK44+TBF2/20.2 | 80,6±12,4 |
| CHB15P | <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> | 65,65±18,39 | N11+OR16 | 84,04±2,37 |
| TBF2/20.2 | <i>Olivibacter oleidegradans</i> | 67,29±3,99 | K404+TBF2/20.2 | 85,75±5,94 |
| GD2A | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 77,21±13,70 | K404+PT2/14B | 86,34±7,12 |
| CW25 | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | 78,41±11,59 | AK44+CHB15P | 92,58±1,56 |
| BA4.9 | <i>Rhodococcus qingshengii</i> | 85,0±1,10 | CHB-15p+N11 | 93,07±0,19 |
| 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 kiváló *atrazine*-bontó képességű 5 vizsgált törzs és 2 keverék közül mindössze a K404 *R. pyridinivorans* törzs volt képes a *terbuthylazine* közepes, 46%-os lebontására.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján):

(I. tézis) 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 szerkezetiileg csupán egy metil-csoportban eltérő *terbuthylazine* 46%-os biodegradációjára.

Az *atrazine*-ra vonatkozó eredményeket nemzetközi folyóiratban közzétük (Háhn et al., 2017).

4.2. *Aliivibrio fischeri* citotoxicitási tesztek

A tiszta hatóanyagok citotoxicitás-mérésének eredményei

Az *atrazine* és *terbuthylazine* hatóanyagokat az akut 30 perces és krónikus 25 órás kontaktidejű teszttel vizsgálva lényeges eltéréseket tapasztaltam a tesztek érzékenységét illetően. A krónikus tesztben a hatóanyagok által kiváltott 50%-os fénykibocsátás csökkenést kiváltó koncentrációk (EC_{50} érték) mindkét vegyület esetében legalább 2 nagyságrenddel alacsonyabbak, mint az akut tesztben, ahol a legmagasabb tesztelt koncentrációban (125 és 100 mg/L) sem mértem gátlást. Ezen vizsgálatok eredményeit a 2. táblázat foglalja össze. A krónikus teszt mindkét hatóanyag esetében a 10 és 15 órás kontaktidőnél bizonyult a legérzékenyebbnek, illetve a statisztikai értékelés alapján a legmegbízhatóbbnak. A továbbiakban, mivel érzékenysége és gyakorlati kivitelezhetősége lehetővé teszi, a bontási maradékanyagok citotoxikus hatását a krónikus AVF teszt segítségével mértem.

2. táblázat - Az *atrazine*-ra és *terbuthylazine*-ra vonatkozó EC₅₀ értékek a meghosszabbított kontaktidejű krónikus teszttel mérve és összehasonlítva az akut 30 perces Microtox® értékekkel.

| Vegyület | Krónikus AVF | | | Akut AVF | |
|-----------------------|--------------|--|----------------|------------|-------------------------|
| | Kontaktidő | EC ₅₀ (mg/L) (95% konfidencia intervallum) | r ² | Kontaktidő | EC ₅₀ (mg/L) |
| <i>Atrazine</i> | 10 h | 2,67 (2,19-3,25) | 0,8899 | 30 perc | >125 |
| | 15 h | 8,28 (6,60-10,37) | 0,8477 | | |
| <i>Terbuthylazine</i> | 10 h | 4,97 (4,04-6,11) | 0,9203 | 30 perc | >100 |
| | 15 h | 9,62 (6,57-14,07) | 0,6796 | | |

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1. és 4.2. fejezetekben bemutatott eredmények alapján)

(II. Tézis) *Atrazine*-ra és *terbuthylazine*-ra nézve a 25 órás kontaktidejű krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt 10 és 15 órás kontaktidőnél a legérzékenyebb: *atrazine*-ra az EC₅₀ 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 nemzetközi folyóiratban közzöltük (Háhn et al., 2017).

A bontási maradékanyagok citotoxicitás-mérésének eredményei

A meghosszabbított, 25 órás kontaktidejű *Aliivibrio fischeri* teszttel *atrazine* esetében az 50%-nál nagyobb degradációt mutató, összesen 13 törzs és 9 keverék maradékanyagát vizsgálva azt tapasztaltam, hogy mindössze 3 törzs és 4 keverék esetében nem volt citotoxikus a biokonverzió terméke. A 4 konzorcium esetében nem csupán a bontás mértéke haladta meg a keverékeket

alkotó törzsek egyéni eredményeit, de a sejttoxikus hatás is teljesen megszűnt minden esetben. A *terbuthylazine*-t egyedülként 46%-ban bontani képes K404 törzs maradékanyagának toxicitása azonban nem szűnt meg.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.2. fejezetben bemutatott eredmények alapján)

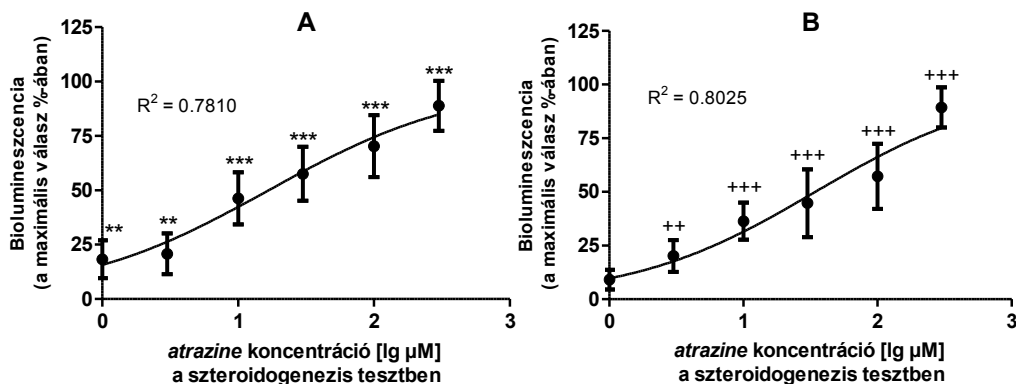
(III. Tézis) A 25 órás kontaktidejű krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt alkalmas az *atrazine* és a *terbuthylazine* hatóanyagok biodetoxifikációjának nyomon követésére. Az *atrazine*-t egyénileg jól bontó törzsek degradációs termékeinek citotoxicitását vizsgálva mindössze 3 esetében (2 *Rhodococcus 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 nemzetközi folyóiratban közzeltük (Háhn et al. 2017).

4.3. Módszerfejlesztés az *atrazine* indirekt endokrin diszruptor hatásának mérésére

Az indirekt, nemi hormon szintézist megzavaró hatás kimutatására kifejlesztett kombinált módszerrel az *atrazine*-t vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a herbicid expozíció hatására koncentráció függő módon nem csak az ösztrogén hatású, de az androgén hatású hormonok szintézise is indukálódott a humán mellékvesekéreg-karcinóma sejtekben, ami a BLYES és BLYAS teszttel mérve emelkedett ösztrogén és androgénhatásban nyilvánult meg. A koncentrációválasz görbéket a 2. ábra szemlélteti. Az eredmények alapján számolt EC_{50} értékek szerint 16,78 ill. 34,38 μ M *atrazine* volt képes a humán sejtek nemi hormon szintézisét oly módon indukálni, hogy azok hatására 50%-kal

emelkedett az ösztrogén és androgén hatást jelző biolumineszcencia a BLYES és BLYAS tesztekben.



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

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (a 4.3 fejezet eredményei alapján):

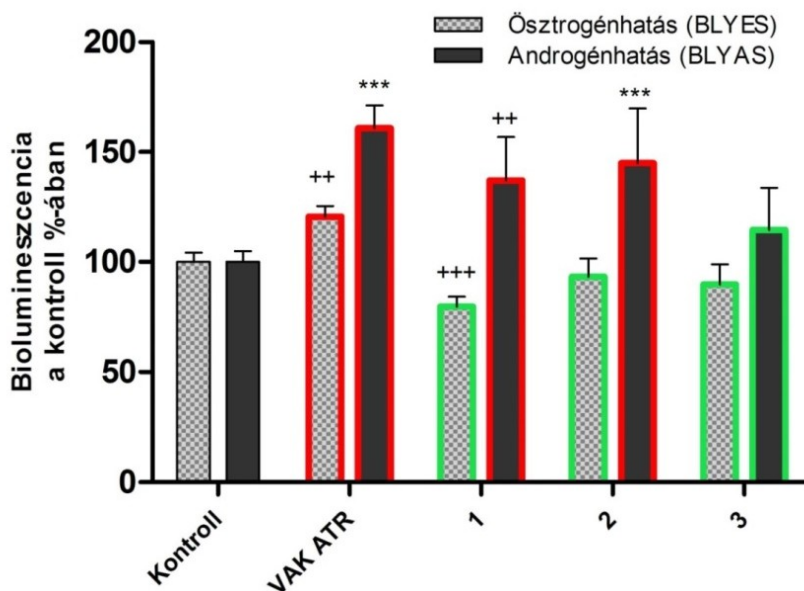
(IV. Tézis) Az *atrazine* indirekt, nemi hormonok szintézisét megzavaró hatásának kimutatására sikeresen fejlesztettem ki egy új, kombinált módszert a H295R humán mellékvesekéreg karcinóma sejtvonalat alkalmazó *steroidogenesis assay*, valamint a BLYES/BLYAS ösztrogén/androgén hatást mérő, élesztő alapú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

(V. Tézis) 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 µM, androgénhatás esetében 34,38 µM). 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 nemzetközi folyóiratban közzétük (Háhn et al., 2016).

4.4. Atrazine biodegradációból származó maradékanyagok indirekt endokrin diszruptor hatásának vizsgálata

Az atrazine-biodegradáció során összesen 3 törzs és 4 keverék esetében nem volt citotoxicitás tapasztalható magas degradációs % mellett. Ezekből 3 maradékanyagot vizsgáltam a kombinált módszerrel, mely indirekt nemi hormon szintézis megzavaró hatás kimutatására alkalmas: a K404 törzs (bontás: 98%), az AK44+CHB15P+TBF2/20.2 (78%) és az AK44+CHB15p keverékek (93%) maradékanyagát. Az eredmények alapján, melyet a 3. ábra szemléltet, megállapítható, hogy egyedül a *R. aetherivorans* AK44 és *R. pyridinivorans* CHB15p törzsekből álló keverék bontási végterméke nem okozott eltérést a kontrollhoz képest sem az ösztrogén, sem az androgén hatású hormonok szintézisében.



3. 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 (táplódat + atrazine); 1 – K404; 2 – AK44+CHB15p+TBF2/20.2; 3 – AK44+CHB15p

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (a 4.1., 4.2. és 4.4. fejezetekben bemutatott eredmények alapján):

(VI. Tézis) 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.

5. 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. 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 hatásfokú bontására. 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 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 megfigyelhető, hogy 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 enzimszereknek 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 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 β -ösztadiol) 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 vizsgálómódszereknek 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 tesztnak 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* biodetoxifikációjára képes mikróbák 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 aromatáz 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 **formázószerek és készítmények vizsgálatára** is. A formázóanyagok ugyanis önmagukban is ökológiai kockázatot jelenthetnek, a segítségükkel pl. vízdoldhatóbbá, 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 biodetoxifikációjára 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 okozati összefüggéseket vonhatók le. Ilyen mikrokozmosz kísérletek megfelelő kivitelezéséhez doktori munkám kísérleti eredményei jó kiindulópontként szolgálhatnak.

6. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Tudományos folyóiratokban megjelent (közlésre elfogadott) lektorált, teljes szövegű tudományos közlemény

J. Háhn, S. Szoboszlay, G. Tóth, B. Kriszt (2017): Assessment of bacterial biotransformation of herbicide atrazine using *Aliivibrio fischeri* cytotoxicity assay with prolonged contact time. *Ecotoxicology*, 26: 648-657. (IF: 1,951)

J. Háhn, S. Szoboszlay, Cs. Krifaton, K. J. Kovács, Sz. Ferenczi, B. Kriszt (2016): Development of a combined method to assess the complex effect of atrazine on sex steroid synthesis in H295R cells. *Chemosphere* 154:507-514. (IF: 4,208)

I. Szabó, S. Szoboszlay, B. Kriszt, **J. Háhn**, P. Harkai, E. Baka, A. Tánicsics, E. Kaszab, Z. Privler, J. Kukolya (2011): *Olivibacter oleidegradans* sp. nov. hydrocarbon degrading strain isolated from a clean-up facility (biofilter) set up on a Hungarian hydrocarbon contaminated site, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2861-2865. (IF: 2,268)

J. Háhn, P. Harkai, Zs. Nagy, E. Kaszab, S. Szoboszlay (2010). Bacterial communities in composts from biomass energy production. In: Hidvégi Szilvia (szerk.) IX. Alps-Adria Scientific Workshop on Resilience within agroecosystems, Session: Land Use II.. Konferencia helye, ideje: Spicak, Csehország, 2010.04.12-2010.04.17. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2010. pp. 337-340. (Növénytermelés; 59.)

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények:

Háhn J., Tóth G., Szoboszlay S., Kriszt B. (2017). Növényvédő szerek biotransformációjára képes mikroba-törzsgyűjtemény kialakítása. In: Darvas B., Bakonyi G., Székács A., Szoboszlay S. (szerk.) VII. ÖKOTOXIKOLÓGIAI KONFERENCIA előadás és poszter kötete, pp. 16-17.

Háhn J., Szoboszlay S., Krifaton Cs., Kovács J. K., Ferenczi Sz., Kriszt B. (2016). Kombinált módszer fejlesztése az *atrazine* H295R sejtek nemihormonszintézisére gyakorolt hatásának vizsgálatára. In: Darvas B., Bakonyi G., Györi J., Major J., Székács A. (szerk.) VI. ÖKOTOXIKOLÓGIAI KONFERENCIA előadás és poszter kötete, pp.15-16.

G. Tóth, **J. Háhn**, S. Szoboszlay, Cs. Krifaton, J. Radó, B. Kriszt (2015). Investigation of the biodegradation and cytotoxicity of various herbicides. *Acta*

Microbiologica et Immunologica Hungarica 62:(Suppl.2) pp. 232-233. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Magyarország: 2015.07.08 -2015.07.10.

J. Háhn, J. Radó, A. Balázs, B. Kriszt, S. Szoboszlay (2012). Investigation of *atrazine* degradation by bacterial strains and consortia. In: K. Márialigeti (szerk.) Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica: Abstracts of the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology. Konferencia helye, ideje: Keszthely, Magyarország, 2012.10.24-2012.10.26. Akadémiai Kiadó, pp. 145-146.

Témában megjelent publikációk összesített impakt faktora: 8,427