

Szent István Egyetem
Biológiatudományi Doktori Iskola

**Nano- és nagyszemcsés cink-oxid ökotoxikológiai vizsgálata
talajlakó szervezeteken**

Kiss Lola Virág
Doktori értekezés (PhD)

Gödöllő
2020

A doktori iskola

megnevezése: SZIE Biológiateadományi Doktori Iskola

tudományága: Biológia tudományok

vezetője: Dr. Nagy Zoltán

egyetemi tanár, DSc

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Biológiateadományi Intézet

Témavezetők:

Dr. Nagy Péter István

egyetemi docens, PhD

Biológiateadományi Intézet

Állattani és Állatökológiai Tanszék

Dr. Seres Anikó

egyetemi adjunktus, PhD

Biológiateadományi Intézet

Állattani és Állatökológiai Tanszék

.....
Dr. Nagy Zoltán jóvánhagyása Dr. Nagy Péter István jóvánhagyása Dr. Seres Anikó jóvánhagyása

Ez az értekezés 4 példányban készült. Ez a ... számú példány.

Tartalomjegyzék

Alapfogalmak	6
Rövidítés jegyzék	8
1. BEVEZETÉS.....	9
1.1. Célkitűzések	11
1.2. Irodalmi áttekintés.....	13
1.2.1. Nanoanyagok.....	13
1.2.1.1. Tesztelési és alkalmazási problémák	14
1.2.1.2. Környezeti koncentráció.....	16
1.2.1.3. Nanoszemcseméretű fém-oxidok a talajban	17
1.2.1.4. Nanoszemcsés cink-oxid	18
1.2.1.5. Nanoszemcsés cink-oxid toxicitási mechanizmusa	19
1.2.1.6. Toxikus hatások mitigálása	20
1.2.1.7. Nanoanyagok közötti interakció.....	21
1.2.1.8. Sejten belüli reaktív oxigéngyök termelődés mérése	22
1.2.2. Talajmikrobióta	22
1.2.2.1. Nano cink-oxid hatása a talajbaktériumokra	23
1.2.3. Talajfauna	25
1.2.3.1. Fonálférges.....	26
1.2.3.2. Nanoszemcsés cink-oxid hatása a fonálférgesre	28
1.2.3.3. Ugróvillások	30
1.2.3.4. Nano cink-oxid hatása az ugróvillásokra.....	32
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	34
2.1. Tesztanyagok és előkészítésük	34
2.2. Pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálatok.....	34
2.3. Cink kioldódás mérés	36
2.4. Baktériumközösség vizsgálatok különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében.....	36
2.4.1. Talajminták gyűjtése és előkészítése.....	36
2.4.2. Foszfolipidzsírsav (PLFA) analízis: teljes biomassza mérés.....	37
2.5. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében.....	38
2.5.1. Tesztközegek elkészítése.....	38
2.5.2. <i>Panagrellus redivivus</i> toxicitási tesztek: különböző tesztközegek.....	38
2.5.2.1. Módszerfejlesztés	40
2.5.3. <i>Folsomia candida</i> toxicitási tesztek: különböző tesztközegek és expozíciós útvonalak	40
2.6. Hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata.....	41
2.6.1. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a <i>Panagrellus redivivus</i> -ra	41

2.6.2.	Nano és nagyszemcsés cink-oxid közötti interakció tesztelése	42
2.6.3.	Sejten belüli reaktív oxigén gyök termelődés mérése	42
2.6.3.1.	Módszerfejlesztés	44
2.7.	Statisztikai kiértékelések	44
3.	EREDMÉNYEK.....	46
3.1.	Baktériumközösség vizsgálatok különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében.....	46
3.1.1.	Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	46
3.1.2.	Vízkapacitás mérés	47
3.1.3.	Foszfolipidzsírsav (PLFA) analízis: teljes biomassza mérés.....	48
3.2.	Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében.....	52
3.2.1.	Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	52
3.2.2.	Cink kioldódás mérés	53
3.2.3.	<i>Panagrellus redivivus</i> toxicitási tesztek: különböző tesztközegek.....	53
3.2.4.	<i>Folsomia candida</i> toxicitási tesztek: különböző tesztközegek és expozíciós útvonalak	57
3.2.4.1.	Mortalitás vizsgálatok.....	57
3.2.4.2.	Reprodukción vizsgálatok	59
3.3.	Hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata.....	61
3.3.1.	Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	61
3.3.2.	Cink kioldódás mérés	63
3.3.3.	N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a <i>Panagrellus redivivus</i> -ra	63
3.3.4.	Nano és nagyszemcsés cink-oxid közötti interakció tesztelése	65
3.3.5.	Sejten belüli reaktív oxigén gyök termelődés mérése	68
4.	DISZKUSSZIÓ	73
4.1.	Baktériumközösségek vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében	73
4.2.	Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében.....	73
4.2.1.	<i>Panagrellus redivivus</i> toxicitási tesztek	74
4.2.2.	<i>Folsomia candida</i> toxicitási tesztek.....	75
4.3.	N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a <i>Panagrellus redivivus</i> -ra	75
4.4.	Reaktív oxigén gyök termelődés módszer értékelése	76
4.5.	Szemcseméretfüggő toxikus hatások és a háttérükben működő mechanizmusok értékelése	76
4.5.1.	Baktériumközösség vizsgálata során	77
4.5.2.	Közegek és expozíciós útvonalak vizsgálata során	77
4.5.3.	Reaktív oxigén gyök termelődés mennyiségének vizsgálata során	78
4.5.4.	N-acetilcisztein alkalmazása során	78
4.5.5.	Két anyag közötti interakció vizsgálata során	79
4.6.	Következtetések összegzése	80
5.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	82

6.	ÖSSZEFOGLALÁS	84
7.	SUMMARY	86
8.	TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK.....	87
8.1.	Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények.....	87
8.2.	Szóbeli előadások az értekezés témájában	87
8.3.	Poszterek az értekezés témájában.....	88
8.4.	Független publikációk	89
9.	MELLÉKLETEK	90
9.1.	Irodalomjegyzék	90
9.2.	További mellékletek	111
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	112

Alapfogalmak

Adsorbens: többnyire nagy fajlagos felületű szilárd anyag, amely gázelegyekből, folyadékelegyekből, vagy oldatokból egyes komponenseket (pl. levegőszennyező vagy vízszennyező anyagokat) adszorpció révén, a felületén koncentrálni, felhalmozni képes.

Agglomeráció: a kolloid rendszert felépítő ionok, atomok, molekulák halmozódásával járó folyamat. A részecskék könnyen diszpergálhatóak, a kötés közöttük nem erős.

Aggregáció: a kolloid rendszert felépítő ionok, atomok, molekulák halmozódásával járó folyamat. A részecskék erősen kötődtek egymáshoz.

Andosol talaj: olyan talaj, amelynek magas a vulkáni eredetű anyag tartalma. Vulkáni hamu talajnak is nevezik. Magas szervesanyag-tartalmú, nagy vízmegtartó vagy kationcserélő képességgel rendelkezik.

Antioxidáns: az antioxidáns oxidációgátló (oxidáció inhibitor), tágabb értelemben oxidációt késleltető vagy gátló anyag.

Bioakkumuláció: vegyszerek (például rovarirtó- vagy gyomirtószer, stb.) koncentrációjának a növekedése a szervezetekben. Az ilyen felhalmozódó vegyületek felszívódásának és a raktározásának mértéke a felhalmozó szervezetekben nagyobb, mint a kiválasztásuké.

Biomagnifikáció: a bioakkumulációra képes perzisztens anyagok (pl. egyes növényvédő szerek) feldúsulása a táplálékláncokban.

Cambisol talaj: olyan talajok tartoznak ebbe a csoportba, ahol a függőleges differenciálódás gyenge. Megfelelőek mezőgazdasági használatra.

Félvezető: a fémek és a szigetelők közötti tartományban számos olyan anyagot találunk, amelyek sem az egyik, sem a másik csoportba nem sorolhatók be. Ezek nem elég jó vezetők, annál viszont jobbak, hogy szigetelésként használhatnánk őket. Ezek a közepes fajlagos ellenállású anyagok a félvezetők.

Fém-oxidok: a fém-oxidok egy kémiai heterogén vegyületcsoport, az oxigén fémekkel alkotott, döntően O^{2-} -ionokat tartalmazó vegyületei.

Fotokatalitikus anyag: olyan anyag, aminél fény hatására különböző kémiai reakciók történhetnek.

Fotovoltaikus anyag: félvezető anyagok, amik képesek a fényt elektromos energiává alakítani.

Kelát: a név a görög "karom" szóból ered és arra utal, hogy bizonyos szerves vegyületek "megragadnak" egyes fémionokat és komplex vegyületet képeznek velük.

Kolloid: a kolloidok olyan oldatok, amelyekben igen apró méretű – 1 nanométertől az 1000 nanométerig terjedő méretű – szemcsék vannak oldva, szétszórva, elkeverve, diszpergálva.

Letális koncentráció (Lethal Concentration, elfogadott rövidítés: LC_x): 10, 20, 50 vagy 80%-ban a tesztesyedek mortalitását okozó koncentráció.

Effektív koncentráció (Effective Concentration, elfogadott rövidítés EC_x): 10, 20, 50 vagy 80%-ban a tesztesyedekre hatást kifejtő koncentráció.

Legkisebb káros hatású koncentráció (Lowest Observed Adverse Effect Concentration, elfogadott rövidítés: LOAEC): azt a legkisebb kísérletben használt koncentrációt értik alatta, mely statisztikailag szignifikánsan eltér a kontroll csoporttól az adott paraméterben.

Mitigáció: egy anyag káros tulajdonságainak enyhítése.

Nanoanyag: a nanoanyag olyan természetes anyag, szándékolatlanul előállított mesterséges anyag vagy szándékosan előállított anyag, amely nem kötött állapotban, aggregátum formájában vagy agglomerátum formájában olyan részecskéket tartalmaz, amelyeknek legalább egy külső mérete a részecskének a darabszám szerinti méreteloszlás alapján vett legalább 50%-a esetében az 1 nm-től 100 nm-ig terjedő mérettartományba esik. Konkrét esetekben, továbbá akkor, ha azt környezetvédelmi, egészségügyi, biztonsági vagy versenyképességi szempontok indokolják, a darabszám szerinti méreteloszláshoz tartozó 50%-os küszöbérték helyett 1%-nál nagyobb, de 50%-nál kisebb küszöbérték alkalmazható.

Nanotechnológia: a nanotechnológia célja a nanométeres tartományba eső eszközök, anyagok előállítása, fejlesztése és alkalmazása.

Nanotudomány: a nanotudomány a nano-mérettartományba eső anyagok tulajdonságait vizsgálja, beleértve a vizsgálati módszereket és azok fejlesztését is.

Prekurzor: a kémiában prekurzor olyan vegyület, mely egy másik vegyületet előállító reakcióban vesz részt.

Reaktív oxigén gyök: a szabadgyökök olyan molekulák vagy molekulafragmentek, amelyek külső elektronpályájukon egy egyedülálló, párosítatlan elektront tartalmaznak, emiatt igen fokozott a reakciókészségük.

Talajremediáció: olyan környezetvédelmi céllal végzett műszaki, igazgatási tevékenység és intézkedéssorozat, amely a károsodott közeg, illetve a szennyezettség megismerése, megszüntetése és utóellenőrzése érdekében történik.

Rövidítés jegyzék

Al₂O₃: aluminium-oxid

APF: aminofenil-fluoreszcein (aminophenyl-fluorescein)

ASTM: Amerikai Tesztelési Társaság (American Society for Testing and Materials)

BET: Brunauer-Emmett-Teller

DNS: deoxiribonukleinsav

EC₅₀: Effectív koncentráció 50% (Effective Concentration 50%)

ELTE: Eötvös Lóránd Tudományegyetem

ISO: Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization)

LC₅₀: Letális koncentráció 50% (Lethal Concentration 50%)

LOAEC: Legkisebb káros hatással járó koncentráció (Lowest Observed Adverse Effect Concentration)

NAC: N-acetilcisztein

nZnO: nano cink-oxid

OECD: Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development)

PLFA: foszfolipidzsírsav analízis (phospholipid fatty acid analysis)

ROS: reaktív oxigén gyök (reactive oxygen species)

SEM: pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope)

TEM: transzmissziós elektron mikroszkóp (transmission electron microscope)

TiO₂: titán-dioxid

WHC: vízkapacitás (water-holding capacity)

XPS: röntgen fotoelektron spektroszkópia (X-ray photoelectron spectroscopy)

XRD: röntgen diffrakciós analízis (X-Ray Diffraction Analysis)

ZnCl₂: cink-klorid

ZnO: cink-oxid

1. BEVEZETÉS

A nanoanyagok alkalmazási területe rendkívül széles, emiatt az utóbbi 30 év során gyakorlatilag mindenhol megjelentek. Felhasználhatják őket a kozmetikai iparban, a gyógyszeriparban, az élelmiszeriparban, az elektronikai és az optikai eszközök gyártásakor. Emellett alkalmazzák a nanoszerkezeteket bizonyos káros molekulák megkötésére, rákkutatásban, növényvédelemben, talajremediáció illetve szennyvíztisztítás során és környezeti detektorokban is. A felhasználás során a méretcsökkenésből adódó megváltozott tulajdonságokat használják ki, ezzel szemben az ebből adódó lehetséges hátrányokkal és veszélyekkel korábban sokkal kisebb mértékben foglalkoztak. Ez a tendencia változóban van, egyre több a nanoanyagok mellékhatásaival foglalkozó vizsgálat, viszont a kutatási eredmények nagy része inkonzisztens (Krug, 2014), az eredmények nehezen összehasonlíthatóak és megismételhetőek a különböző módszerek használata miatt, mivel elfogadott szabvány nem áll rendelkezésre. Emellett sok tesztelési hiba merül fel az elérhető kutatások vizsgálata során. Gyakori a felhasznált anyagok hiányos jellemzése, nem megfelelő koncentrációk használata vagy akár a szükséges kontroll csoportok kihagyása.

A nanoméretű fém-oxidokra jellemző a gyakori felhasználás, többek között a különleges katalitikus aktivitásuk, az optoelektronikában felhasználható tulajdonságaik, valamint az erős antimikrobiális aktivitásuk miatt (Ma et al., 2013). A cink-oxid nanostruktúra az egyik leggyakrabban alkalmazott nanoanyag közülük. Fotokatalitikus és kémiai aktivitása magas, ezért környezeti kármentesítésre, mint pl. talajremediációra vagy víztisztításra is alkalmazzák, ami által ezek az anyagok közvetve és közvetlenül is bekerülhetnek a talajba. A nanoszemcsés cink-oxid toxicitása több tulajdonságból eredhet, ilyen lehet a kioldódott cink-ionok, a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződése és a potenciálisan méretből adódó hatások, pl. az élőlények sejtjei és a nanorészecskék közötti közvetlen találkozások. A nZnO kibocsátás az anyagok sokoldalú alkalmazhatóság miatt (pl.: víztisztítás, talajremediáció, orvosi felhasználás) előreláthatólag nem fog csökkenő tendenciát mutatni, annak ellenére sem, hogy rendkívül sok adat áll rendelkezésre a potenciális veszélyekről és kockázatokról. Ezáltal fontos feladattá vált a már kijutott vagy még legyártatlan anyagok megismerése és azok toxikus hatásainak csökkentése. Erre megfelelő módszer a negatív hatások olyan módú enyhítése vagy akár megszüntetése, hogy a számunkra előnyös tulajdonságok megmaradjanak különböző mitigáló anyagok segítségével. A nZnO esetében ilyenek lehetnek a különböző természetes szerves anyagok, bevonatok és akár antioxidánsok, mint például az aszkorbinsav vagy az N-acetilcisztein. További problémát

jelenthet, hogy a nagymennyiségű kibocsátás miatt a melléktermékként, hulladékként vagy célzottan kikerült nanoanyagok véletlenszerűen keveredhetnek más anyagokkal vagy nanoanyagokkal. Ebben az esetben számtalan új anyag és anyagkombináció jöhet létre. Emellett a köztük létrejövő interakció során a keverékek alapanyagaitól függően megváltozhatnak a lehetséges hatások. Az ilyen jellegű vizsgálatok nagyon ritkák, annak ellenére, hogy rendkívül fontos információkat nyújthatnak a részecskeméretből adódó toxikus hatások vizsgálataiban során.

A talajba jutó nano-fémoxidok drasztikus változásokon mehetnek keresztül, kötődhetnek a talajszemcsékhez, bekövetkezhet agglomeráció vagy aggregáció a részecskék között, reakcióba léphetnek a talajban található szerves anyagokkal vagy a talajvízbe is oldódhatnak. Ezért is nagyon fontos a közvetlen expozícióban is részesülő talajorganizmusokra kifejtett hatások vizsgálata a nanoszemcsés cink-oxid esetében, lehetőleg környezetileg releváns tesztközegben, hogy figyelembe tudjuk venni a talajt, mint befolyásoló tényezőt. A talajban élő szervezetek eltérően reagálhatnak a szennyezésekre, ezért is lényeges olyan indikátor fajok használata, amelyek különböző talajlakó élőlény csoportokat képviselnek. Természetesen ezzel a faj- vagy egyedszintű érzékenység nem képezhető le, mégis több információt nyújt az eltérő hatásokról, mintha csak egy-egy csoporton végeznék a kísérleteket. Mivel a talajlakó élőlények aktívan vesznek részt a talaj jellemzőinek kialakításában, befolyásolják a talajok fizikai és kémiai tulajdonságait, fontos szerepet játszanak a tápanyagok körforgalmában, a mineralizációban, a talajok strukturális változásaiban, a biotikus szabályozásban és a detoxifikációban is (Bakonyi et al., 2009; Lavelle, 2002), ezért az őket ért szennyezések az egész ökoszisztémára kifejthetik a hatásaikat.

A nanoszemcsés ZnO egyes talajbaktériumokra kifejtett hatásait számos közlemény vizsgálja. E szervezetek jelentősége kiemelkedően nagy, mivel alapját képezik a táplálékhálózatnak és az elsődleges szereplői a globális biogeokémiai körforgalmaknak. A táplálékláncban betöltött helyzetük miatt részt vehetnek a fém-oxidok felhalmozódásában is, tehát mindenképp jól alkalmazhatóak tesztorganizmusként toxikológiai vagy ökotoxikológiai vizsgálatokban. A kísérletek nagyon különböző eredményeket hozhatnak, a tesztfajtától, a használt módszertől, illetve az anyag kémiai összetételétől függően. A vizsgált nZnO-k általában a baktériumok közösségének összetételére és diverzitására gyakorolnak hatást (Bour et al., 2015). A legtöbb kísérletben erősebb hatása volt a nanoméretű ZnO-nak, mint nagyszemcsés megfelelőjének ugyanabban a koncentrációtartományban (Gajjar et al., 2009; Gunalan et al., 2013).

A nZnO talajfaunára kifejtett hatásait összegyűjtő tanulmány alapján a legmagasabb kockázatnak a mikrofaunába tartozó állatok vannak kitéve (Kiss et al., 2020). A mikrofaunát nagyon jól reprezentálják a fonálféreg, mint tesztállatok. A fonálféreg ideálisak a laboratóriumi tesztek elvégzésére, mert kevés helyet igényelnek, könnyen kezelhetők és tenyésztethetők, emellett

általában rövid életciklus jellemzi őket. Az ökotoxikológiai és genetikai vizsgálatokban főképp a Rhabditida rendbe tartozó *Panagrellus redivivus* (Linné 1767), *Plectus acuminatus* (Bastian 1865) és különösen a *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1899) számít elterjedt modellállatnak. A nanoszemcsés ZnO erősen toxikus ezekre a teszttállatokra (Hrács et al., 2018; Khare et al., 2011; Ma et al., 2011; Wang et al., 2009), kimondottan szemcseméretfüggő toxicitást viszont kevés esetben mutattak ki (Khare et al., 2011). A magas érzékenység többek között a tesztközegek hatása miatt is kialakulhatott, ugyanis legtöbb esetben vízben végezték a vizsgálatokat.

A mikrofauna mellett a mezofauna tagjai is erősen ki vannak téve a különböző talajszennyezések hatásainak. Az ugróvillások és azon belül a *Folsomia candida* faj használatos a legtöbb szabvány szerinti ökotoxikológiai vizsgálatnál. A *F. candida* rendkívül népszerű, mivel szűznemzéssel szaporodik és nagyon könnyen tartható laboratóriumi körülmények között (Krogh, 2008). Az ugróvillás egyedekre a környezeti koncentrációnál jóval töményebb oldatok esetében tapasztaltak csak elhullást okozó toxicitást (Kool et al., 2011; Waalewijn-Kool et al., 2012, 2014), viszont az állatok reprodukciójára már alacsonyabb koncentrációkban is találtak negatív hatásokat (Kool et al., 2011).

1.1. Célkitűzések

Kísérleteim során fontosnak tartottam a nanoszemcse-méretű ZnO hatásait minél jobban kiismerni. Szerettem volna reprezentatív, környezetileg releváns kísérleteket összeállítani, ezért három olyan talajlakó élőlénycsoportot választottam vizsgálataimhoz indikátorként, amelyek erősen ki vannak téve a nanoszemcsés cink-oxid általi szennyezésnek és irodalmi adatok alapján magas érzékenységet is mutatnak erre a nanoanyagra. Így esett a választásom a talajflórából a baktériumközösség vizsgálatra, a mikrofaunából egy bakterivor fonálféreg faj, a *Panagrellus redivivus* és a mezofaunából egy szabvány kísérletekben alkalmazott ugróvillás faj, a *Folsomia candida* alkalmazására. Emellett szerettem volna bemutatni, hogy mennyire befolyásolja a kísérleti eredményeket a felhasznált tesztközeg és expozíciós útvonal. A legtöbb kísérletnél problémát jelent a kapott eredményekből a környezeti hatás prognosztizálása, mivel a laboratóriumi tesztkörülmények sok esetben teljesen eltérnek a környezetben előforduló viszonyoktól. Ennek következtében laboratóriumi kísérletekben torzított hatásokkal szembesülhetünk. A két kísérletcsoport fő célja az volt, hogy közelebb hozzam a laboratóriumban kapott és a környezetileg releváns hatásokat. Emellett célom volt a felhasznált anyag hatásmechanizmusának is a megfelelő mélységű megismerése. Ehhez egy könnyen és gyorsan működtethető tesztrendszerrel választottam, hogy kísérleteimet minél többször és több tényezőt vizsgálva tudjam elvégezni (dózis-hatás vizsgálat *P. redivivus* teszt szervezettel). Szerettem volna a szemcseméretbeli toxicitási különbségek hátterét megvizsgálni, ezt három oldalról közelítettem

meg. Először is egy ismert kelátképző hatással is rendelkező antioxidánst vontam be a tesztbe. Az volt a hipotézis, hogy általa két toxicitási folyamatot is befolyásolni tudok (a reaktív oxigén gyököket és az ionos hatásokat), sőt ezáltal akár teljes toxicitást is csökkenthetem. Ezáltal kiszűrhetőek a nanoreleváns toxikus hatások. Emellett a két anyag keverékének toxicitás befolyásoló hatását is megvizsgáltam, ezáltal reprezentálva a környezetben fellelhető keveredéseket és a két anyag egymásra kifejtett hatásából szerettem volna egyéb információkat kideríteni a mechanizmus háttéréről. Ebből adódóan választottam a sejten belüli reaktív oxigén gyök mérés módszert is, amire szabványt nem találtam, így meglévő módszerek (Sarasiya & Norman, 2018; Wang et al., 2018; Yoon et al., 2018) módosításából fejlesztettem ki az általam használt eljárást, majd az eredmények által elbíráltam a kiindulási hipotéziseimet.

Vizsgálati céljaim pontokba szedve a következők voltak:

- 15 nm és 140 nm ZnO hatásának vizsgálata természetes talajmintában lévő baktériumközösségekre;
- különböző tesztközegek hatásának vizsgálata ökotoxikológiai tesztrendszerekben:
 - környezetileg releváns tesztközeg kísérleti fejlesztése *Panagrellus redivivus* tesztállaton a 15 nm és a 140 nm ZnO jelenlétében;
 - *Folsomia candida* tesztfaj esetében a különböző expozíciós útvonalak (kutikulán keresztüli és orális valamint csak orális expozíciót engedélyező közegek) hatásának vizsgálata a két ZnO szemcse toxicitására;
- a szemcseméretbeli toxicitási különbségek kimutatása, a hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata a felhasznált ZnO részecskéknél:
 - N-acetilciszetin mitigációs ágens segítségével rámutatni a toxicitási mechanizmusban rejlő különbségekre;
 - interakciós kísérletek végzése a környezetben megtörténő keveredés okozta toxicitásbeli változások szimulálására és a szemcseméretbeli toxikus hatások specifikus vizsgálata céljából;
 - gyakorlatban is alkalmazható mérési módszer kifejlesztése a *P. redivivus* sejten belüli reaktív oxigén gyök mennyiségének a mérésére;
 - szemcseméretbeli toxicitási mechanizmusának vizsgálata a termelődött reaktív oxigén gyök mérés által.

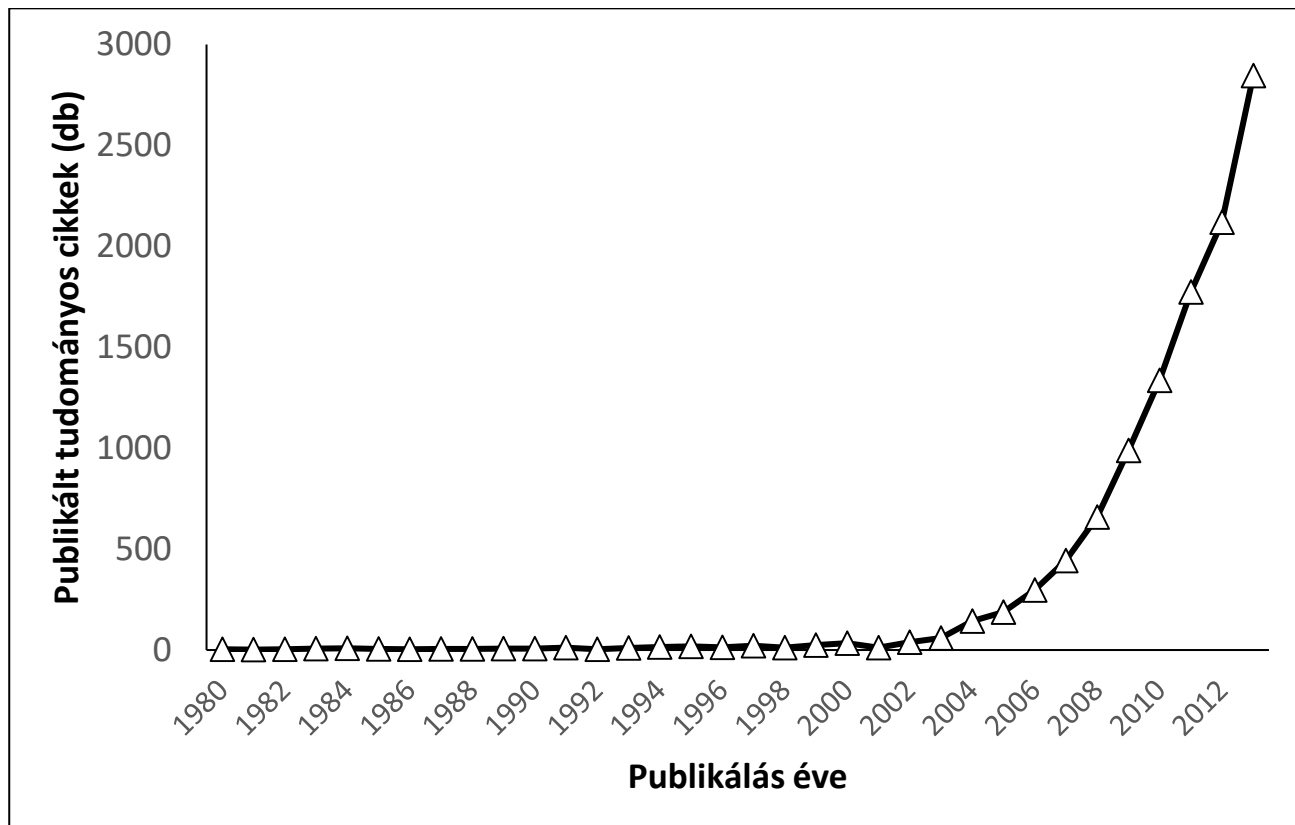
1.2. Irodalmi áttekintés

1.2.1. Nanoanyagok

Nanoanyagnak azokat a részecskéket nevezzük, amelyek legalább egy dimenzióban a részecskéknél a darabszám szerinti méreteloszlás alapján vett legalább 50%-a esetében az 1 nm-től 100 nm-ig terjedő mérettartományba esnek (Rauscher et al., 2015). Így a nanorészecskék mellett a nanoszálak, -csövek, amelyek két dimenzióban és a nanolapok, amik már csak egy dimenzióban tartoznak ebbe a mérettartományba, szintén nanoanyagnak tekinthetők. A nanorészecskék keletkezhetnek természetes vagy emberi (antropogén) úton, melléktermékként vagy célzott előállítás során. Létrejöhetnek kőzetmállás, erdőtüzek, porviharok és vulkánkitörések során. Ezek mellett számos élő szervezet (pl.: vírusok) lebomlása által keletkezhet nanoméretű részecske és az emberi szervezetben is megtalálhatóak ilyen mérettartományú struktúrák (Jeevanandam et al., 2018). Az űrben némely csillagot körülvevő por- és gázfelhő is nagy mennyiségben tartalmaz különböző szerves és szervetlen nanoanyagokat (Tielens, 2012). Az emberi tevékenység melléktermékeként létrejövő nanoanyagok főképpen a belsőégésű motorok (dízel), erőművek, hulladék- és egyéb égetőművek használata során keletkeznek (Pándics, 2008). A tervezett előállítás során a nagyobb szemcsékből mechanikai és kémiai módszerekkel hozhatók létre nanoméretű részecskék vagy akár kémiai építkezés által irányított reakciókkal olyan méretűvé növeszthetik az anyagot, ami számukra kívánatos. A nanoanyagok csoportosítására számos elv alapján történhet. Csoportosíthatjuk őket fizikai és kémiai tulajdonságok alapján, mint pl. kémiai struktúra, méret, oldhatóság, morfológia, aggregációs képesség; felhasznált és kijuttatott mennyiség alapján, biológiai elérhetőség alapján és az általuk kifejtett hatások alapján is (Giusti et al., 2019). Az anyag szerinti csoportosítás alapján beszélhetünk szén alapú (nanocsövek, fullerének, grafén stb.), szervetlen (fémek pl.: arany, ezüst, fém-oxidok, mint pl.: cink-oxid, titán-dioxid), szerves (dendrimek, micellák, liposzómák) és kompozit összetételű nanoanyagokról (többfajta nanorészecskének vagy nano- és nagyszemcsés anyagoknak a keveréke) (Jeevanandam et al., 2018).

A nanoanyagok manapság gyakorlatilag mindenhol megjelennek. Főbb felhasználási területeik a kozmetikai ipar, a gyógyszeripar, az élelmiszeripar, az elektronikai és az optikai eszközök gyártása. Használhatják a nanoszerkezeteket egyes káros molekulák megkötésére (Gupta et al., 2015), rákkutatásban (Hanley et al., 2008), növényvédelemben (Gogos et al., 2018), talajremediáció illetve szennyvíztisztítás során (Anjum et al., 2016) és környezeti detektorokban (Willner & Vikesland, 2018) is. Fogyasztóvédelmi szempontból aggályos, hogy a nanotechnológia alkalmazásával készült termékeknek nagyrészt nincs különleges ismertetőjele, így a vevők nem

tudhatják, hogy milyen összetételű terméket vásárolnak. A felhasználás során a méretcsökkenésből következő megváltozott tulajdonságokat használják ki, ugyanakkor az ebből adódó lehetséges hátrányokkal és veszélyekkel sokkal kisebb mértékben foglalkoznak. Szerencsére ez a tendencia megváltozni látszik, az utóbbi években drasztikusan növekszik a nanoanyagok mellékhatásaival foglalkozó kutatások száma (1.ábra).



1. ábra. Nanotoxikológia témában publikált munkák száma 1980 és 2013 között (Krug, 2014).

A nano mérettartományban az anyagok fizikai, kémiai és mechanikai tulajdonságai lényegesen megváltoznak. A méret csökkenésével egyenesen arányosan nő a fajlagos felület, viszont a tömeg nem változik (Cattaneo et al., 2009). A megnövekedett fajlagos felület és a reakcióképesség megkönnyítheti az anyagok biológiai elérhetőségét és megnövelheti a toxicitását. Jiang et al. (2009b) leírta, hogy a nanorészecskék képesek átjutni a legerősebb biológiai membránokon is, mint például a vér-agy gáton vagy a placentán, az előbbin keresztül akár a központi idegrendszerbe is bekerülhetnek. A nanoanyagok hajlamosak az aggregációra, a felhasználás során azonban ez a tulajdonság nem mindig előnyös, így ezt egyes esetekben különböző felületkezelésekkel próbálják megakadályozni.

1.2.1.1. Tesztelési és alkalmazási problémák

Az általános tesztelési gyakorlati módszereket nem feltétlenül használhatjuk a nanoanyagok vizsgálatánál. Sokkal több szempontot és változót kell figyelembe vennünk egy ilyen

kísérlet során. Mivel nincs egységes tesztelési rendszer, minden laboratórium más módszerrel vizsgálja a nanoszemcsés anyagokat, így az eredmények nehezen összevethetőek és reprodukálhatóak. Az első legfontosabb lépés a felhasznált nanoanyagok megfelelő jellemzése, ami által már könnyebben lehet értelmezni a született eredményeket. Legfontosabb megvizsgálandó tulajdonságok a méret, a forma, a kompozíció (Jiang, et al., 2009a), a töltés (Rivera-Gil et al., 2013), a porozitás és a felületi feszültség, ahhoz hogy megértsük és előre jelezhessük a felhasznált anyagok viselkedését. A cél az lenne, hogy minden felhasznált nanoanyag megfelelően karakterizált legyen. E tekintetben azonban nagy nehézséget jelentenek a folyamatosan megjelenő új anyagok. Emellett a nanospecifikus tulajdonságokból adódóan, nem elég egy típust egyszer megvizsgálni, de még egy adott anyag egyszeri vizsgálata sem elegendő. Különböző laboratóriumokban eltérő szintetizálási módszereket alkalmazhatnak, már a legkisebb változtatás a készítés, a kezelés és a feldolgozás során megváltoztathatja a nanoanyagok tulajdonságait. Emellett a nano-mérettartományban az anyagok folyamatosan változnak. A részecskék oldódhatnak, aggregálódhatnak, idővel akár a méretük és a formájuk is változhat, a felületükön képesek megkötni részecskéket a környezetükből, meleg és fény hatására megsérülhetnek vagy megváltozhatnak egyes tulajdonságaik. Ezek a változások másodpercek vagy akár évek elteltével is megtörténhetnek (Baer et al., 2013). A megvásárolt nanoanyagok esetében ezért is lehetnek nagy különbségek a gyártó által feltüntetett és a tényleges tulajdonságok között. A használható jellemzési módszerek az anyag kémiai összetételétől függenek, mást alkalmazunk egy micella és mást egy fémoxid vizsgálatokor, mást száraz, por állagban és mást szuszpenziók esetében. Emellett fontos az elérhető módszereket tudatosan megválasztani az alapján, hogy milyen kérdésre keresünk választ. A legjobb egyes módszereket olyan kombinációban alkalmazni, hogy ki tudjuk használni az előnyeiket és kiküszöböljük a lehetséges hátrányaikat (Mourdikoudis et al., 2018). A méret és a forma jellemzésére használhatunk elektron mikroszkópos vizsgálatokat (transzmissziós és pásztázó), dinamikus fényszórás vizsgálatot, a felület jellemzéséhez a Brunauer–Emmett–Teller (BET) analízist, a kristályszerkezet általános jellemzéséhez a leggyakrabban röntgen diffrakciót (XRD), az elektronszerkezet jellemzéséhez röntgen fotóelektron spektroszkópiát (XPS), a biológiai hatások felderítésére pedig in vitro és in vivo kísérleteket. Ezeken felül ismerünk speciálisabb tulajdonságokat is megmutató vizsgálatokat, mint az anyagok sterilitását, tisztaságát, agglomerációját, szedimentációját, kristályszerkezet változását tesztelő módszereket (Kumar & Dixit, 2017) vagy a kioldódott ionok, termelődött reaktív oxigén gyökök mennyiségének a mérését. Léteznek már olyan új, fejlett módszerek is a nanoanyagok vizsgálatára, ahol akár egy darab nanorészecskét is meg tudunk vizsgálni (folyékony-sejt és atom felbontású transzmissziós mikroszkópos vizsgálat: LC-AR TEM), akár

3D képet is tudunk készíteni róluk (elektron tomográfia) és a dinamikus rendszerek sem jelentenek problémát (szuper felbontású mikroszkóp vizsgálatok) (Modena et al., 2019).

A pontos jellemzés mellett nagyon fontos odafigyelni a nanoanyagok tesztelésénél a megfelelő koncentrációk használatára. Egyes tesztrendszerekben az indokolatlanul magas koncentrációk az eredmények téves magyarázatához vezethetnek. Például a potenciális toxikus hatások kimutatása helyett, a magas koncentráció miatt ezek az anyagok teljesen ellephetik az adott tesztrendszert, megakadályozva a tesztorganizmusok tápanyag- és oxigén ellátását, ezáltal pusztulásukat okozva (Wittmaack, 2011; Yazdi et al., 2010). Emellett figyelembe kell venni a nanoanyagok rendkívül magas reaktivitását, így bármivel interakcióba kerülhetnek, amivel a teszt beállítása és lefolyása során találkozhatnak, többek között a tesztoldattal, a felhasznált eszközökkel és a szennyeződésekkel, amik ezeken vagy akár a levegőben találhatóak (Krug, 2014). A nanoanyagok vizsgálata során elengedhetetlen a megfelelő referencia vagy kontroll minta alkalmazása, anélkül, hasonlóan az előbb említett feltételekhez, nem lehet megfelelően kiértékelni egy-egy vizsgálat eredményeit. Petersen et al. (2014) több fontos kontroll kísérletet is részletez, például: felületi bevonat kontroll (ha a tesztelt nanoanyag van bevonat), oldószer kontroll (ha a kísérlet során felhasználásra kerül oldószer), oldott ion kontroll, filtrátum kontroll, nagyszemcsés kontroll, fényviszony kontroll és szonikációs kontroll. A biológiai jellemzés történhet *in vivo* és *in vitro*. Az *in vivo* tesztek drágák, hosszú ideig tartanak és etikai problémákat is felvethetnek, ezért főként az *in vitro* tesztelés a gyakori, amelyek során arra törekednek, hogy megőrizték a hatékonyságot és a kockázatértékelés megbízhatóságát. Ezen felül kontrollált körülmények között több faktort is vizsgálhatnak, többek között a nanoszemcsék kötődését a sejtekhez, a sejten belüli elhelyezkedésüket, esetleges változásokat a gén vagy fehérje expresszióban, a sejtorganellek és membránok struktúráját, az életképességet és a sejtciklust is (Kahru et al., 2008).

1.2.1.2. Környezeti koncentráció

Jelenleg az antropogén úton kikerült nanoanyagok tényleges környezeti koncentrációjának megmérése még nincs lehetőség, ezért különböző modellek alapján próbálják ezeket meghatározni. A modellekben összevetik egyes nanoanyagok múltbéli, jelenlegi és a lehetséges jövőbeli gyártási, felhasználási és kibocsájtási rátáját különböző környezeti kompartmentekre vizsgálva (levegő, víz, talaj, üledék). Nehézséget jelent a tényleges kibocsájtási adatok összegyűjtése, mivel a gyártók nem szívesen adnak ki ilyen jellegű információkat (Giese et al., 2018; Wagner et al., 2014), emellett a nem szándékos, szennyezésekből és hulladékokból adódó expozíciót még nehezebb megbecsülni. Ismerni kell az adott nanoanyagok útját a környezetben, biotranszformációját és toxikus hatásait. Ehhez fontos lenne a megfelelő toxicitási adatok birtokába jutni. Mostanra már tetemes mennyiségű vizsgálat született a nanoanyagok

mellékhatásainak felderítésére, viszont a kutatási eredmények nagy része inkonzisztens (Krug, 2014), az eredmények nehezen összehasonlíthatóak a különböző módszerek miatt. Ezt bővebben kifejttem a *2.1.1. Tesztelési és alkalmazási problémák* c. fejezetben. Továbbá az alkalmazott modellek többsége nem veszi figyelembe, hogy a nanoanyagokat tartalmazó felhasználási tárgyak nem feltétlenül egyszeri expozíciót jelentenek a felhasználó számára, hanem a felhasználási idő alatt folyamatosan engedhetik ki magukból a nanorészecskéket (Sun et al., 2017; Wagner et al., 2014). Garner et al. (2017) modellje alapján a környezeti koncentráció előreláthatólag növekedni fog a jövőben, a megfelelő szabályozás és a hulladékkezelés hiányában. Különösen lényeges lehet ez a változó időjárási viszonyok mellett és olyan területeken, ahol talajremediáció vagy víztisztító telepek iszapjának kihelyezése során közvetlenül bekerülhetnek a nano-fémoxidok a talajba. A jelenleg rendelkezésre álló tudományos információk alapján a legmagasabb kockázatnak a mikrofauna tagjai vannak kitéve (Kiss et al., 2020).

1.2.1.3. Nanoszemcseméretű fém-oxidok a talajban

A fém-oxidok egy kémiai heterogén vegyületcsoportba tartoznak, nanoméretű formáikat gyakran használják többek között a különleges katalitikus aktivitásuk, az optoelektronikai tulajdonságaik, valamint az erős antimikrobiális hatásaik miatt (Ma et al., 2013). Főképp szennyvíziszapként, de talajremediációs alkalmazás során vagy ipari hulladékként is bejuthatnak a talajba (Rajput et al., 2018). A talajban a nano-fémoxidok hatása megváltozhat a föld feletti vagy vizes közegekhez képest. Ennek oka a talaj teljesen eltérő fizikai és kémiai struktúrája és komplexitása (Bakonyi et al., 2009). A talajba került nano-fémoxidok jelentősen átalakulhatnak (pórusvízben oldódhatnak, talajszemcséhez kötődhetnek, szerves anyagokkal reakcióba léphetnek, felületükön megköthetnek különböző talaj alkotóelemeket, szennyeződések), amelyek által megváltozhat a biológiai elérhetőségük, toxicitásuk. A nano-fémoxidok toxikus hatásait befolyásolhatja a talaj típusa (pH, szerves anyag tartalom, szerves komplexek, szabad ionok, stb.), az adott anyag fizikai és kémiai tulajdonságai, de a terhelésnek kitett populáció, illetve egyed érzékenysége is. Bár méretükből adódóan átjuthatnak a talajpórusokon, nagy eséllyel kötődhetnek a talajszemcsékhez, agglomeráció (visszafordítható) vagy aggregáció (nem visszafordítható) következhet be a részecskék között és ezáltal csökkenhet a biológiai elérhetőségük (Baalousha & Lead, 2009; Dunphy Guzman et al., 2006; Sokolov et al., 2015). A nano-fémoxidok megváltoztathatják a talajszemcsék felületét, így felmerülhet egyéb talajszennyezések mobilizálásának kockázata is (Rajput et al., 2018). Emellett különböző abiotikus és biotikus folyamatok által a talajvízbe oldódva bejuthatnak folyók vagy tavak vízkészleteibe is (Boxall et al., 2007). A transzportfolyamatokat és a toxicitást erősen

befolyásolhatja a talaj pH értéke (Dunphy Guzman et al., 2006; Rajput et al., 2018). A jelenlegi tudományos álláspont szerint a kezeletlen (bevonat nélküli) nanoanyagok sorsa és viselkedése a talajban megegyezik a hozzá hasonló kémiai összetételű természetes kolloidokéval. Tehát ugyanazon környezeti faktorok hatására hasonló változások történnek a részecskékkel. A perzisztens szerves bevonatok jelenlétében viszont ezek a folyamatok megváltozhatnak. Ilyen bevonatok nem léteznek a természetes kolloidoknál, így a részecskék viselkedése is különbözni fog ezektől. Emellett azoknál az anyagoknál is problémát jelenthet az összehasonlítás, amiknek nincsen természetes hasonmása (Wagner et al., 2014). Garner et al. (2017) a saját fejlesztésű nanoFate modell alapján kijelentette, hogy még a legjobban oldódó nano-fémoxidok is képesek a bioakkumulációra a talajban, és ezáltal toxikussá válhatnak. Ez különösen igaz a magas kibocsájtási rátával rendelkező ZnO és TiO₂ nano-fémoxidokra. Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy a talajba jutó nano-fémoxidok bekerülhetnek a táplálékláncokba (Bigorgne et al., 2011; Boxall et al., 2007; Pappas et al., 2017) és biomagnifikáció is lehetséges (Hou et al., 2013; Yeo & Nam, 2013). Más vizsgálatok szerint a táplálékláncban történő akkumuláció nagyon alacsony (Gogos et al., 2016). McKee & Filser (2016), illetve Tourinho et al. (2012) egy-egy összefoglaló cikkben gyűjtötték össze az éppen aktuális adatokat a talajba jutó és az ottani életközösségekre ható nanoanyagokról, köztük a nano-fémoxidokról is. A vizsgálati háttér módszerek fejlődését a két tanulmány megjelenése közötti időszakban már az is mutatja, hogy míg Tourinho et al. (2012) azt tapasztalta, hogy kevés vizsgálat során történt megfelelő analitikai jellemzés az anyagoknál, addig McKee & Filser (2016) munkájába már csak korrekt analitikai adatokat tartalmazó vizsgálatokat fogadtak be és így is nagy mennyiségű adatot tudtak összegyűjteni.

1.2.1.4. Nanoszemcsés cink-oxid

A cink-oxid nanostruktúra (nZnO) az egyik leggyakrabban alkalmazott nanofém-oxid. A nanocink-oxid vezetőképessége, fotovoltaiikus és szorpciós tulajdonságai miatt ipari érdeklődésre tarthat számot. Fotokatalitikus aktivitása is magas és kémiaiilag aktív, ezért környezeti kármentesítésre, mint pl. talajremediáció vagy víztisztítás is alkalmazzák. A víztisztítás során, a szennyező anyagok oxidálása mellett, nanomembránokban és adszorbensként is felhasználható (Anjum et al., 2016; Gehrke et al., 2015; Khan et al., 2012; Lu et al., 2016). Orvosi alkalmazása során akár potenciális rákellenes szerként is alkalmazható lehet. Kutatások alapján kimutatták, hogy képesek az erősen osztódó sejtek szelektív pusztítására (Hanley et al., 2008; Rasmussen et al., 2010; Sivakumar et al., 2018). Ezt a szelektivitást erősíteni is lehet tumort célzó ligandumok hozzákapcsolásával. Emellett a nanocink-oxid segítségével egyéb hatóanyagok is szállíthatóak a célterületekre (Hanley et al., 2008) és a nanorészecskék a tumorsejtek korai detektálására is

felhasználhatóak (Rasmussen et al., 2010). Ezeken felül még a nanoszemcsés cink-oxidot használhatják termékek adalékanyagaiként, élelmiszerekben (Zn tápanyagforrás), kozmetikai szerekben és naptejekben a kiváló UV abszorpciós és reflexiós tulajdonságai miatt (Ma et al., 2013). A kozmetikában felhasznált nanorészecskék hatására a termékeknek jobb textúrája, élénkebb színe lett és a hatóanyag bőrbe való bejutása is könnyebbé vált. A nZnO széleskörű és bővülő előállításának és használata következtében egyre nő a magas koncentrációban kikerülés kockázata (Coll et al., 2015), és ezáltal veszélyt jelenthet többek között a talajszervezetekre is. Az eddigi becsült adatok alapján a nZnO környezeti koncentrációja növekedést mutat az évek elteltével (2009: 0,24-0,661 µg/kg talajban, 0,22-1,42 µg/l víztisztító telep kifolyó (Gottschalk et al., 2009); 2014: 1,52-1,82 µg/kg talajban, 2,3-21 µg/l víztisztító telep kifolyó (Sun et al., 2016)). A nZnO vegyületekre magyarországi adatot egyáltalán nem találunk, de cink tartalom meghatározásra is a nagyon kevés vizsgálat született. Korábbi, 1976-os mérések alapján talajtípusonként eltérő összes cink tartalmat mértek: homoktalajokban kevesebb (30 mg/kg), az erdőtalajokban közepes (70-115 mg/kg), míg a csernozjom talajokban több (120-150 mg/kg) cink található (Mengel, 1976). Egy 2002-2005 között zajló, Magyarországon több különböző területen történő műtrágyázási kísérlet során is mértek cink tartalmat a mintaterületek talajaiból (0,9–2,7 mg/kg) (Lehoczky, 2006). Átlagosan 100 mg/kg Zn található a magyarországi talajokban, ahol pedig szennyvíziszap kihelyezés is fennáll ott 200 mg/kg Zn a terhelhetőségi határérték (Kádár, 2013). Általánosan elmondható, hogy a magyarországi talajok cink ellátottsága alacsony (Kádár, 2008; Péntek & Fazekas, 2016), de ezekből az adatokból nem lehet messzemenő következtetést levonni a hazai talajok nZnO tartalmára vonatkozóan.

1.2.1.5. Nanoszemcsés cink-oxid toxicitási mechanizmusa

A nanoszemcsés cink-oxid toxicitása több tulajdonságból eredhet, ilyen lehet a kioldódott cink-ionok, a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződése és egyéb potenciálisan a méretből adódó hatások, pl. az élőlények sejtjei és a nanorészecskék közötti közvetlen érintkezések. Ezek a toxikus hatások nem különíthetők el élesen egymástól, a méretfüggő hatások és a nagymennyiségű ion kioldódása önmagában is elősegítheti a ROS termelődését, emellett a nanoanyagok kémiai és fizikai tulajdonságaitól függően a részecskék felületén is termelődhetnek oxigén gyökök (Park et al., 2011; Salianni et al., 2016). A túltermelődött ROS oxidatív stresszt indukál, ami károsíthatja a lipid sejteket, szénhidrátokat, fehérjéket és a DNS-t, megváltoztathatja a sejtek jelzéseit és mozgását, apoptózist válthat ki, ezáltal citotoxikus és daganat képző hatása is lehet (Fu et al., 2014; Huang et al., 2019; Sirelkhatim et al., 2015). A nanocink-oxid által spontán termelődött ROS függhet fény vagy UV hatásától (Ma et al., 2014; Yang & Ma, 2014), a felületi egyenetlenségek és hibák által megváltozott folyamatoktól és a felületen lezajló aktív redox reakcióktól (Salianni et

al., 2016). Emellett a fiziko-kémiai összetételük (felületi töltés és reaktivitás, méret, forma, agglomerációs állapot, diszperziós faktor, oldódás) és a szintézisük is befolyásolhatja a termelődött mennyiséget (Park et al., 2011). Ezek közül az egyik legfontosabb tényező a szemcseméret. A méret csökkenéssel a részecskék közvetlenül is behatolhatnak a sejtekbe és az ott kifejtett oxidatív stressz révén, akár sejthalált is okozhatnak. Emellett kimutattak toxicitási különbséget az eltérő formák között is. A gömb, rúd és hópehely forma közül a hópehely (Przybyszewska & Zaborski, 2009), a rúd és a hexagonális tál közül, pedig a tál forma (Mclaren et al., 2009) bizonyult a reaktívabbnak. Ezenfelül a morfológia befolyásolhatja a sejtbe kerülést is, a rúd és a gömb alak könnyebben, egyéb alakok nehezebben jutnak át a sejthártyán vagy a sejt falon (Chithrani et al., 2006; Gratton et al., 2008).

A nanocink-oxid toxicitásával foglalkozó cikkek nagy része sugallja, hogy a kioldódott ionok játsszák a legnagyobb szerepet a toxicitásban (Hrács et al., 2018; Ma et al., 2009, 2013; Sávoly et al., 2016; Wang et al., 2016, 2009), de kevesen kötik össze ezt a hatást az oxidatív sérülésekkel. Pedig több olyan kutatás is van, ahol kimutatták, hogy a kioldódott ionok különböző folyamatok zavarásával (pl.: mitokondrium megfelelő működése) a sejtben belüli ROS képződést gerjeszthetik (Kim et al., 2010; Song et al., 2010; Xia et al., 2008). Habár Shen et al. (2013) vizsgálataiban kimutatta, hogy antioxidáns hatására nem szűnt meg teljesen a nZnO toxikus hatása, így feltételezhető, hogy a ROS-on felül egyéb tényezőket is befolyásolnak a kioldódott ionok. Mégis a ROS mennyiségének mértéke nagyban összefügg a nanoanyag oldhatóságát befolyásoló tényezőkkel pl. pH (Waalewijn-Kool et al., 2013), talajszemcsék és/vagy szerves anyagok jelenlétével (Bian et al., 2011; Li et al., 2011b; Miao et al., 2010; Sávoly et al., 2012). Ezáltal elmondható, hogy a fiziko-kémiai tulajdonságok mellett az expozíciós körülmények is nagyban befolyásolják a nZnO toxicitási mechanizmusát.

1.2.1.6. Toxikus hatások mitigálása

A nZnO kibocsájtás az anyagok sokoldalú alkalmazhatósága, környezetvédelmi (pl.: víztisztítás, talajremediáció) és orvosi felhasználása miatt előreláthatólag nem fog csökkenni, annak ellenére sem, hogy temérdek adat áll rendelkezésre a potenciális veszélyeiről és kockázatairól. Így a gyártás visszaszorítása helyett a már kijutott vagy még legyártatlan anyagok megismerése és azok toxikus hatásainak csökkentése a fő cél. Erre jó módszer a különböző mitigációs ágensek használata, amik segítségével úgy enyhíthetőek vagy akár meg is szüntethetőek a negatív hatások, hogy a számunkra előnyös tulajdonságok megmaradjanak. A nZnO toxikus hatásait sikeresen csökkentették többek között különböző természetes szerves anyagokkal (Kteeba et al., 2017), bevonatokkal (pl.: szilícium bevonat (Chia & Leong, 2016)) és akár antioxidánsok

felhasználásával, mint például aszkorbinsav (Li et al., 2012) vagy N-acetilcisztein (El-Shorbagy et al., 2019; Li et al., 2018; Liu et al., 2017; Ma et al., 2014; Ostrovsky et al., 2009; Pati et al., 2016; Wang et al., 2014; Yang & Ma, 2014). Az N-acetilcisztein (NAC) több módon is képes megvédelmezni a szervezetet a nZnO hatása által keletkezett ROS-tól és az ionos toxicitástól. Képes direkt módon eltávolítani a szabad gyököket, emellett elősegítheti az antioxidáns enzimek képződését azáltal, hogy prekuzorként funkcionál a glutation szintézisben (Sun, 2010) és szabályozhatja az AP-1 luciferáz aktivitást is (Shi et al., 2017). Továbbá kelátképző hatóanyagként is működhet, így csökkentve a kioldódott ionok által okozott toxikus hatásokat (Flora & Pachauri, 2010). Ezen tulajdonságok miatt széleskörűen alkalmazzák fémek (Huang & Lemire, 2009; Nour-Eldein et al., 2017) és különböző nanoanyagok (Shi et al., 2017; Wu et al., 2012) toxikus hatásainak vizsgálatakor. A toxikus hatások csökkentése mellett a NAC különösen alkalmas a nanoanyagok, ezen belül kifejezetten a nZnO toxicitási mechanizmusának vizsgálatára is, mivel mind az ionos, mind a reaktív oxigén gyökökből fakadó toxicitást befolyásolja.

1.2.1.7. Nanoanyagok közötti interakció

A nagymennyiségű nanoanyag kibocsájtás mellett egy új keletű problémát vet fel, hogy az anyagok közötti interakció során megváltozhatnak a lehetséges hatások. A keverékek esetében alapanyagaiktól függően más és más hatással szembesülhetünk: ezen anyagok toxikussága összeadódhat, de akár erőteljesen megnövekedhet vagy csökkenhet is. A véletlenszerű keveredés folyamatosan jelen van a melléktermékként, hulladékként kikerült nanoanyagok között, ebben az esetben számtalan anyag és anyagkombináció jöhet létre. Emellett tudatosan kialakított keverékeket is létrehozhatnak annak érdekében, hogy növeljék egyes anyagok hatásfokát, például antibiotikumokat, peszticideket és akár rákellenes gyógyszereket is keverhetnek különböző nanoanyagokkal (Guo et al., 2008; Hackenberger et al., 2019; Sharma et al., 2016), vagy akár két különböző nanoanyag keverékét is felhasználhatják, legtöbb esetben egymás hatásának felerősítésére (Jafari et al., 2011; Li, et al., 2011a; Mott et al., 2007; Tong et al., 2014, 2015). Ezzel szemben egy bizonyos nanoanyag különböző szemcseméretű formáinak a keverékének a hatásaira többszörös keresés után (Google Scholar, ScienceDirect, ResearchGate oldalak kereső motorjaiban, az „interakció”, „szinergikus toxikus hatás” és a „nanoanyag” kulcsszavak angol nyelvű megfelelőit felhasználva) sem találtam elvégzett vizsgálatokról szóló tudományos munkákat. Annak ellenére is fennáll ez a helyzet, hogy az ilyen jellegű kísérletek rendkívül fontos információkat nyújtanának a részecskeméretből adódó toxikus hatások vizsgálati során.

1.2.1.8. Sejten belüli reaktív oxigéngyök termelődés mérése

A reaktív oxigéngyök termelődés mérésének módja nagyban függ a minta típusától és a tesztanyagtól. Mérhető a felhasznált anyag önmagában (pl. fény hatása történő változások) (Ma et al., 2014, 2013), sejtben vagy szövetben és állatból is. Az első két esetben specifikus ROS önmagában meghatározható, míg az utolsó típusnál általában már az oxidatív stressz által kiváltott hatásokat mérik vér vagy vizelet mintából (pl.: glutation szint mérés, lipid peroxidáció mérése). Sejtből vagy szövetből történő mérés esetén a keresett oxigéngyöktől függ a megfelelő módszer használata (Kalyanaraman et al., 2012). Minden oxigéngyöknek meg van a maga specifikus szerepe az élő sejtben, emellett gyökönként változó reaktivitás jellemző rájuk. Ezért is nagyon fontos a specifikus mérési módszer használata (Nagano, 2009). A sejten belüli termelődés mérése során vizsgálhatjuk magát az izolált mitokondriumot (Mattiasson, 2004; Shen et al., 2013) vagy az egész sejtet, szövetet. NZnO kezelés hatására kiváltott oxidatív stresszt vizsgáló publikációt bőven találunk. A legtöbb nZnO által generált ROS mérés esetében 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetátot (DCFH-DA) használnak indikátorként, annak ellenére, hogy erősen oxidálódik fény hatására és nem specifikusan méri az oxigén gyököket (Kim et al., 2010; Liu et al., 2017; Ng et al., 2017; Ramasamy et al., 2014; Rui et al., 2013; Ryu et al., 2014; Song et al., 2010; Zhao et al., 2013).

1.2.2. Talajmikrobióta

A talajban élő mikroorganizmusok rendkívül nagy faj- és egyedszámban fordulnak elő. Ide tartoznak a talajlakó baktériumok, gombák és algák is. A talaj felső 0-2 cm-ben számuk csekély a szélsőséges UV sugárzás, a hőmérséklet és a nedvességtartalom-ingadozások miatt. A legtöbb mikroszervezet a talaj 15-25 cm-es rétegében él, majd 150-250 cm-ig számuk folyamatosan csökken. A talajbaktériumok fontos szerepet töltenek be a szerves és szervetlen anyagok lebontásában és ezáltal feltárásában más szervezetek számára (pl.: *Pseudomonas sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Apergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pencillium sp.*) a nitrogénkötésben (pl.: *Azotobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Rhizobium sp.*) és az ehhez szervesen kapcsolódó tápanyagforgalomban is (ammonifikáló, nitrifikáló, denitrifikáló baktériumok) (Abbott & Murphy, 2003). Emellett az egészséges talajszerkezet kialakulásában is részt vesznek, és jelentős tápanyagforrást jelentenek a talajban élő egyéb szervezetek számára. A táplálékláncban betöltött helyük miatt akár a fém-oxidok biomagnifikációjában is részt vehetnek (Ma et al., 2013). A talajban található szennyezőanyagok detoxifikációját is elősegítik. A talajban aerob és anaerob baktériumokat is találhatunk, az oxigén ellátottságtól függően nő vagy csökken az arányuk.

1.2.2.1. Nano cink-oxid hatása a talajbaktériumokra

A fém-oxidok toxikus hatásait elsősorban patogén baktériumokon (Dhanalakshmi et al., 2013; Gunalan et al., 2013; Jayaseelan et al., 2012; Song et al., 2010; Zhang et al., 2007) és ökológiai szempontból fontos szerepet betöltő baktériumokon tesztelték (Adams et al., 2006; Dimkpa et al., 2011; Jiang, et al., 2009b; Sharma et al., 2010) A kísérletekben leggyakrabban használt végpontok a növekedésgátlás és a sejtek életképessége voltak (Ma et al., 2013).

A kísérletek nagyon különböző eredményeket hozhatnak a tesztfajtól, a használt módszertől, illetve az anyag kémiai összetételétől függően (1. táblázat). A legnagyobb hatása a fém-oxidoknak a baktériumközösségek összetételére és diverzítására volt, valamint csökkentette a mikrobiális biomasszát (Bour et al., 2015).

A nZnO fitotoxicitása ismert, kevés vizsgálat irányul azonban a baktériumokkal mutualista kapcsolatban élő növények tesztelésére. Bandyopadhyay et al. (2015) kísérletében nZnO, nagyszemcsés ZnO és ZnCl₂ hatását vizsgálták nitrogénkötő baktériummal (*Sinorhizobium meliloti*) beoltott lucernára (*Medicago sativa*). Három koncentrációval dolgoztak: 250, 500 és 750 mg/kg Zn. Eredményeik szerint a nZnO kevésbé bizonyult toxikusnak, mint a ZnCl₂. A nagyszemcsés ZnO ezekkel ellentétben serkentette a növény növekedését. A nZnO hatását talajbaktériumok közül különböző *Pseudomonas* fajokra is vizsgálták. A *Pseudomonas chlororaphis* 06 (Dimkpa et al., 2011) és a *Pseudomonas putida* KT2440 (Gajjar et al., 2009) fajok, illetve törzsek eltérő módon reagáltak a nZnO-ra. A Pc06 törzs ellenállóbbnak bizonyult a *Pseudomonas putida* KT2440-nál vizes oldatban. Dimkpa et al. (2011) kísérletében mind a nZnO, mind a cink ionok akkumulálódtak a *P. chlororaphis* 06 sejtjeiben. A nZnO hatása a tesztekben alkalmazott koncentrációk esetében ezekre a fajokra inkább bakteriosztatikus, mint letális. A nagyszemcsés ZnO egyáltalán nem volt toxikus (Gajjar et al., 2009). Gunalan et al. (2013) a biológiai és a kémiai úton előállított nZnO hatását tesztelték és hasonlították össze hagyományos antimikrobiális szerekkel, patogén baktériumokon (*Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*). A kísérletek során azt tapasztalták, hogy a biológiai úton előállított nZnO-nak a legmagasabb az antibakteriális hatása, azonban ennek okát nem fejtették ki.

Baktériumközösségek vizsgálata során főként diverzitásbeli és szerkezeti változásokat (Akyol et al., 2019; Ge et al., 2011; Yamindago et al., 2019), illetve akár teljes biomassza csökkenést (Ge et al., 2011) is megfigyeltek. Emellett alacsonyabb koncentrációkban (0,2 és 1 mg/l) a nanoszemcsés ZnO szelekciós nyomása szignifikánsan elősegítette az antibiotikum rezisztencia gének sokszorozódását és terjedését is (Chen et al., 2019). Sharma et al. (2010) telepszámlálós módszerrel tesztelték a nZnO hatását a baktériumközösségekre. Eredményeik alapján a nZnO jelentős mértékben gátolja a *Pseudomonas* fajok szaporodását. Fang et al. (2013) nAl atommal adalékolt nZnO-dal kezelték a *Pseudomonas* fajokat. Az adalékolás során a ZnO

kristályszerkezetébe épülnek be az Al atomok. A kísérletben az ezáltal megváltozott tulajdonságok (pl. kristályminőség) hatásait vizsgálták a baktérium fajokon. A nAl atommal való adalékolás azonban nem változtatta meg a nZnO toxikus hatását ezekre a fajokra.

1. táblázat. Különböző szemcseméretű ZnO fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint toxicitása egyes talajbaktérium fajokra (A koncentrációknál azt az értéket tüntettem fel, ahol a legnagyobb növekedésgátlást tapasztalták.)

Teszt fajok	Anyag származása	Részecske nagyság* (nm)	Koncentráció	Hatás**	Referencia
Patogén fajok					
<i>Citrobacter freundii</i>	kémiai úton előállított	25	10,8 mM	100% ng.	(Gunalan et al., 2013)
	biológiai úton előállított	40	10,2 mM		
<i>Proteus mirabilis</i>	kémiai úton előállított	25	8,6 mM	100% ng.	
	biológiai úton előállított	40	7,8 mM		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	biológiai úton előállított	57,72	25 mg/l	22±1,8 mM ng.	(Jayaseelan et al., 2012)
Ökológiai szempontból kiemelt fajok					
<i>Bacillus subtilis</i>	Zhejiang Hongseng Material Technolgy Co.	20	20 mg/l	100% mort.	(Jiang, et al., 2009b)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sigma-Aldrich	480	500 mg/l	98±1,4% ng.	(Adams et al., 2006)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Sigma-Aldrich	<100	500 mg/l	14,8% ng.	(Dimkpa et al., 2011)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zhejiang H.M. T.C.	20	20 mg/l	100% mort.	(Jiang, et al., 2009b)
<i>Pseudomonas sp.</i>	kémiai úton előállított	28 F 3,8 SZ 3,7 V	100 mM	120 CFU/ml	Sharma et al. 2010

Megjegyzés:*F: felület aktív anyag nélkül, SZ: szobahőmérsékleten, V: vákuum alatt; ** n.g.: növekedésgátlás; mort.: mortalitás.

1.2.3. Talajfauna

A talajfauna tagjai aktívan vesznek részt a talaj jellemzőinek kialakításában, befolyásolják a talajok fizikai és kémiai tulajdonságait. Fontos szerepet játszanak a tápanyagok körforgalmában,

a mineralizációban, a talajok strukturális változásaiban, a biotikus szabályozásban és a detoxifikációban is (Bakonyi et al., 2009; Lavelle, 2002).

A talajállatokat csoportosíthatjuk funkció (lebontó, ragadozó, parazita) vagy a talajban töltött idő szerint (pl. permanensen vagy csak időszakosan otthonuk a talaj), illetve annak alapján, hogy mely talajréteg az élőhelyük (pl. aljnövényzet, talajfelszín vagy felsőbb talajrétegek). Testátmérőjük alapján mikro-, mezo- és makrofaunáról beszélhetünk. A mikrofaunához tartozó állatok (pl. állati egysejtűek, fonálférgesek, kerekcsigák, medveállatkák) főképp a szerves és szervesetlen anyagok feltárásában, a mikrobiális biomassza szabályozásában, a nitrogén/szén körforgalomban töltenek be fontos szerepet. Emellett jelentős tápanyagbázist biztosítanak a mezo- és makrofauna ragadozóállományának, valamint egyes toxikus anyagok lebontásában is részt vesznek. A mezofauna a mikroorganizmusok szelektív fogyasztása révén fontos szabályozó szerepet tölt be, például az ide tartozó ugróvillások szelektíven fogyasztják a gomba és baktérium populációkat, mely által közvetett befolyásuk van a lebontó folyamatokra. Ezen felül a humifikációban is szerepük lehet, mivel a nagy mennyiségű ürüléktermeléssel táptalajt biztosíthatnak a lebontó szervezeteknek. Az ugróvillásoknak emellett szerepük van a mikorrhiza gombák terjesztésében (Seres & Bakonyi, 2002; Seres et al., 2003) és jelentősek, mint a talajfauna ragadozóinak táplálékbázisa. A makrofauna tagjai az úgynevezett „talajmérnökök”. Ezek végzik a talajaggregátumok képzését, befolyásolják a talaj levegő ellátását, aprózódását és fontos szerepet töltenek be ragadozó szervezetként. A gyűrűsférgesek jelentősen befolyásolják a talaj minőségét, forgatják, keverik a talajt. Ürülékük sok tápanyagforrást tartalmazhat a növények vagy a mikroflóra tagjai számára.

1.2.3.1. Fonálférgesek

A legkorábbi ismert adatok (említések) a fonálférgesekről közel 4000 évvel ezelőttről származnak (pl. Ebers-papirusz, i.e. 1500 körül). Az eddig leírt fajok száma 20 000 körül van, ebből körülbelül 800-at jegyeztek fel eddig Magyarországon.

A fonálférgeseket két csoportra oszthatjuk: élősködő (*Nematoda parasitica*) és szabadon élő (*Nematoda libera*) fonálférgesekre. Ezek a fonálférgesek a természetben bárhol szabadon előfordulhatnak (édes- és tengervíz üledékében, talajban) vagy pedig növényekhez kötöttek, tehát a közelükben élnek vagy valamilyen formában belőlük táplálkoznak. Ez a növény számára lehet semleges vagy ártalmas, sőt kórokozó is, mivel a fonálférgesek vektorként is funkcionálhatnak és így megfertőzhetik a növényt különböző hordozott vírusokkal. A növényeken vagy növényekben élő fonálférgeseket, növényi kártevő fonálférgeseknek vagy fitonematodáknak hívjuk (Andrássy & Farkas, 1988). A fitonematodák a szabadon élő fonálférgesekhez tartoznak.

A fonálférgék mindenütt, ahol az életfeltételeik adottak, megtalálhatóak, roppant tömegeik révén uralják az egyes életközösségeket. A lényeges szempont számukra a talaj víztartalma, már a talajszemcsék közötti kapilláris hézagokban összegyűlt víz is elegendő nekik (Andrássy & Farkas, 1988), még a sivatagi talajban is képesek megélni (Freckman et al., 1975), viszont porszáraz talajban nem életképesek. Emellett érzékenyek a talaj hőmérséklet változásaira is. Ezért a globális felmelegedés következtében kialakuló hőmérséklet- és nedvesség változások befolyásolhatják a talajban élő fonálférgék összetételét (Bakonyi & Nagy, 2000). A fonálférgék extrém mélységekben is megtalálhatóak, dél-afrikai bányákban 0,9-3,6 km mélységben elhelyezkedő földalatti vízkészletekből vett mintákban is sikerült kimutatni baktériumevő nematodákat. Ezek az eddigi legmélyebben megtalált, a hőséget és az óriási nyomást is elviselő többsejtű élőlények (Borgonie et al., 2011).

Méretük rendkívül változatos, a szabadon élő fonálférgék a milliméteres mérettartományba tartoznak, a paraziták viszont akár több méteresre is megnőhetnek. A szabadon élő nematodák alapvetően négy táplálkozási formát mutatnak, amihez szájszervük és életmódjuk is alakult: baktériumevők, alga- és törmelékevők, növényi nedvszívók és ragadozók (Yeates et al., 1993). A fonálférgék négyszeri vedléssel érik el az ivarérettségüket, miközben állandóan táplálkoznak és nőnek, hat fejlődési stádiumot különböztetünk meg: pete, négy különböző lárva és a felnőtt stádium. Többnyire hím és nőstény állatokat is találhatunk, egyes fajok azonban parthenogenetikusan szaporodnak (Ruppert et al., 2004). A fonálférgék természetes ellenségei kétféleképpen lehetnek: ragadozók vagy élősködők. Ragadozóik is elsősorban a fonálférgék közé tartoznak (pl. a Mononchida és Dorylaimida rendek egyes fajai). Rajtuk kívül más szervezetek is korlátozhatják a létszámukat, pl.: egyes mérgező növények, velük táplálkozó, gombák, egysejtűek és többsejtű ragadozók egyaránt. Érdekességként meg lehet említeni a Hyphomycetes csoportba tartozó alsóbb rendű gombákat, amelyek ragadozók és fonálférgékre specializálódtak. Legnagyobb tömegben a talajban élnek, más szervezetek fogyasztásával szabályozó szerepet tölthetnek be, kulcsfontosságú szerepük van a talaj táplálékhálózatában (Chen & Ferris, 1999; Ruppert et al., 2004). Részt vesznek a tápanyagok körforgásában, különösen a nitrogén felszabadításában van nagy szerepük (Anderson et al., 1982; Buchan et al., 2013; Savin et al., 2001), ezáltal a talaj termékenységéhez is hozzájárulnak (Chen & Ferris, 1999). Emellett elpusztult tetemeik természetes tápanyagforrásként is jelentősen javítják a talajminőséget. Legnagyobb mennyiségben a rizoszférában találhatóak meg. A talajszemcséket körülvevő kapilláris vízréteg megfelelő élőhely számukra. A talajokhoz hasonlóan az édesvizek és a tengerek életében is fontos szerepet játszanak.

Több évtizede alkalmazzák a fonálférgéket biológiai indikátorként terepi munkálatok és laboratóriumi tesztek során. A fonálférgék ideálisak laboratóriumi tesztek végzésére, mert kevés

helyet igényelnek, könnyen kezelhetők és tenyésztethetők, emellett rövid életciklussal rendelkeznek. Fogékonyak a talaj állapotára, így jól indikálhatják annak minőségét, korát és szerkezetét is. Kutikulájuk átengedheti az élőhelyükön található xenobiotikumokat, nagyon érzékenyek a különböző talajszennyeződésekre (Sochová et al., 2006). Nagyrészt szabadon élő, baktériummal táplálkozó fajokat használnak tesztállatként, de láthatunk példát növényi kártevő (Hrács et al., 2018; Sávolý et al., 2015) és entomopatogén (Petrikovszki et al., 2019) fonálférgekre irányuló vizsgálatokra is. Az ökotoxikológiai és genetikai vizsgálatokban főképp a Rhabditida rendbe tartozó *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900), kisebb mértékben pedig a *Panagrellus redivivus* (Linné 1767) és *Plectus acuminatus* (Bastian 1865) számítanak elterjedt modellállatoknak (Höss & Williams, 2009; Sochová et al., 2006). Az utóbbi években egyre több vizsgálat fókuszál a mortalitás mellett érzékenyebb végpontokra is (molekuláris elváltozások, egyedfejlődés, reprodukció, mozgásképesség) (Hagerbaumer et al., 2015). A fonálférgek nagy előnye az, hogy érzékenyen és más talajállatoknál rövidebb idő alatt reagálnak a különböző szennyezőanyagokra (Höss & Williams, 2009).

A *Panagrellus redivivus* egy szabadon élő, baktériumokkal táplálkozó fonálféreg faj, amely legtöbb esetben magas szervesanyag tartalmú élőhelyeken található meg, mint a rothadó gyümölcsök, sörélesztő vagy akár a talaj. Egy időben közkedvelt tesztállat volt különböző biológiai és ökotoxikológia vizsgálatok során (Samoiloff, 1987; Samoiloff et al., 1980; Srinivasan et al., 2013), később ezt a szerepet a *C. elegans* vette át, magas érzékenysége, rövidebb életciklusa, egyszerűbb reprodukciója (önmegtermékenyítés) és különböző technikai szempontok miatt (Boyd & Williams, 2003). Emellett a *C. elegans* fajra több mint húsz ISO, OECD és ASTM tesztszabványt is alkalmazhatunk, viszont több szempontból – például hőtűrés (Laws et al., 2005), ökológiai relevancia (Boyd & Williams, 2003) – még mindig érdemes visszanyúlni a *P. redivivus* használatához. Ezen felül fontos tényező, hogy a *C. elegans*-t évtizedek óta laboratóriumban tenyésztik, azonosítása talajmintákból rendkívül nehéz, így lehetnek olyan esetek, amikor a velük való vizsgálat nem szül releváns eredményeket (Sochová et al., 2006).

1.2.3.2. Nanoszemcsés cink-oxid hatása a fonálférgekre

A fénoxidok vizsgálatok főként a *C. elegans* és kisebb mennyiségben a *P. redivivus* fajra vonatkozóan találunk adatokat és nagyrészt a nZnO és nTiO₂ hatását vizsgálták (2. táblázat).

Wang et al. (2009), valamint Khare et al. (2011) kísérleteiben erősen toxikusnak bizonyult a nZnO a *C. elegans* fajra. Wang et al. (2009) vizsgálatok a nagyszemcsés és a nano ZnO toxicitása között nem találtak számottevő különbséget. Khare et al. (2011) két szemcseméretet is vizsgáltak (25 és 100 nm) közülük a kisebb szemcseméretű anyag volt toxikusabb. Mindkét

vizsgálatnál azt állapították meg, hogy a nZnO részecskékből kioldódó cink ion játszott szerepet a toxikus hatás kiváltásában. Ma et al. (2011) a ZnO nanorészecskék fototoxicitását vizsgálták. Kísérleteik során természetes és mesterséges fénynek tették ki a nZnO-dal és nagyszemcsés ZnO-dal kezelt *C. elegans* fonálféreg fajt. A természetes fény hatására már 2 órás expozíciós idő alatt erősen megnövekedett a mortalitás, viszont a mesterséges fényenél nem tapasztaltak ennyi idő alatt toxikus hatást. A nZnO volt a toxikusabb a két anyag közül, habár mind a nZnO, mind a nagyszemcsés ZnO hasonló méretűvé aggregálódott, ami arra enged következtetni, hogy a toxicitás inkább az eredeti szemcsemérettől függ és nem az aggregátumoktól. Sötétben egyik anyagnál sem tapasztaltak hatást. Sávolgy et al. (2016) a növényi kártevő *Xiphinema vuittenezi* (Nematoda: Dorylaimida) fajon tesztelték a nZnO-ot. Vizsgálataiknak fő célja a kioldódott ionok és a nano tulajdonságokból eredő Zn felvétel és toxicitás összehasonlítása volt, ezért a nagyszemcsés és a nZnO mellett ZnSO₄ oldattal is kezelték az állatokat. Tesztjeik alapján a nagyszemcsés és a nano szerkezetű ZnO esetében szignifikánsan magasabb volt a Zn felvétel, mint a ZnSO₄ oldatnál. A környezetileg relevánsabb teszt módszer kifejlesztéséhez nem csak Milli-Q vizes oldatból, hanem talajoldatos keverékből is megvizsgálták a Zn felvételt. Ebben az esetben szignifikánsan kisebb volt a felvétel, mint a talajoldat nélküli tesztrendszerben. Legkevésbé toxikusnak a nagyszemcsés anyag bizonyult, így azt a következtetést vonták le, hogy a nZnO toxicitása a kioldódott ionok és a nano tulajdonságokból eredő toxikus hatások összességén alapul. Hrács et al. (2018) két különböző táplálkozási stratégiájú fonálféreg érzékenységét vizsgálták nano és nagyszemcsés ZnO-ra. Emellett az állatok Zn felvételét is mérték. A részecskeméret sem a toxicitást, sem a Zn felvételt nem befolyásolta a *P. redivivus* esetében, ezzel ellentétben a *X. vuittenezi* faj érzékenyebben reagált a nZnO-ra, ugyanakkor a Zn felvétel mennyiségében itt sem volt különbség.

2. táblázat. Különböző szemcseméretű ZnO fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint toxicitása szabadon élő fonálférgekre (Nematoda)

Teszt fajok	Anyag származása	Részecske nagyság	Vizsgálati idő	Hatás**	Referencia
		nm		LC ₅₀ (mg/l)	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Hongchen M. S.&T. co.	20	24 óra	81,6	(Wang et al., 2009)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Sigma-Aldrich	<25	24 óra	0,32	(Khare et al., 2011)
		<100		2	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Alfa-Aesar	60±25	2 óra	TNF: 38	(Ma et al., 2011)
			24 óra	MLF: n.h. Össz.: 17 S: n.h.	
<i>Xiphinema vuittenezi</i>	Sigma-Aldrich	177,35±12	24 óra	5 : 87,5 ± 9,6% mort.	(Sávoly et al., 2016)
<i>Xiphinema vuittenezi</i>				3,34	
<i>Panagrellus redivivus</i>	University of Szeged, Department of Applied and Env. Chem.	25,08±9,92	24 óra	1,63	(Hrács et al., 2018)
<i>Xiphinema vuittenezi</i>		220,92±124,25		2,38	
<i>Panagrellus redivivus</i>				57,8	

Megjegyzés: *TO: talajoldat, ÉA: élelmiszer adalékanyag; ** TNF: természetes napfény, MLF: mesterséges laboratóriumi fény, Össz.: a TNF és a MLF 24 órás értékeinek együttes LC₅₀ értéke S: sötét; n.h.: nincs hatás, mort.: mortalitás.

1.2.3.3. Ugróvillások

Az ugróvillások (Collembola) a hatlábúak (Hexapoda) egy ősi csoportja. A mezofauna tagjai közé tartoznak, világszerte elterjedt állatok, csak a tengerek és óceánok nyíltvízi területein nem találhatóak meg. Élhetnek a talaj felszínén, a talajban, a korhadó avarban, a fák kérge alatt és

magukon a növényeken is. Az utóbbi ugyanúgy jellemző mind a szárazföldi, mind a vízinövényekre (Dányi & Traser, 2008). Több, mint hatezer fajuk ismert a világon. Magyarországon jelenleg 410 ugróvillás faj ismert.

Fontos szerepet töltenek be a talaj-ökoszisztémában, jelentősek a lebontásban, mint a fő lebontó mikrobapopulációk szabályozó szervezetei (Gange, 2000; Seres, 2009). Az ugróvillások rendkívül fontos központi szerepet játszanak a talaj szerkezetének kialakulásában, a növényi maradványok, gombák fogyasztásával, aprító tevékenységükkel hozzájárulnak a humuszképződéshez, illetve ürülékük, mint mikroszkopikus szerves struktúrák, megnövelik az anyagok hozzáférhetőségét a baktériumok számára. Emellett jelentősek lehetnek a mikorrhiza gombák terjesztésében (Klironomos et al., 1999; Seres & Bakonyi, 2002; Seres et al., 2014) és a talajfauna ragadozóinak táplálékbázisaként is (Dányi & Traser, 2008). A remediációs folyamatokban is részt vesznek és érzékenyek a talajszennyezés hatásaira (Waalewijn-Kool & Diez-Ortiz, 2013). Fajonként és különböző abiotikus és biotikus faktorok hatására eltérően befolyásolják a szén és a nitrogén mineralizációt (Filser, 2002). Különböző táplálkozású ugróvillás fajokat ismerünk, ezek között lehetnek ragadozók is. Általában széles táplálkozási spektrum jellemző rájuk, fogyaszthatnak gomba spórát, hifát, zuzmókat, mohákat, növényi maradványokat, baktériumokat, algasejteket és fonálférgeket is (Hufnagel et al., 1999; Parkinson & Whittaker, 1978). Az ugróvillások ivarérettség után egész életük során vedlenek, akár negyven alkalommal is. Eközben morfológiai változásokon mennek keresztül, egyre sötétebb és kontrasztosabb színűk lesz. A környezeti tényezők is eredményezhetnek morfológiai változásokat az ugróvillásoknál, ez jócskán megnehezítheti fajaik felismerését (Dányi & Traser, 2008).

A szabvány szerinti ökotoxikológiai tesztelésnél használják a *Folsomia candida* (Willem 1902) és a *Folsomia fimetaria* (Linné 1758) fajt. A *F. candida* rendkívül népszerű, mivel szűznemzéssel szaporodik egy *Wolbachia* fertőzésnek köszönhetően, és nagyon könnyen tartható laboratóriumi körülmények között (Krogh, 2008). A szűznemzést a fertőzés váltja ki, mivel a *Wolbachia* baktérium csak a petesejtben fér el, a spermiumban nem, így érdeke, hogy csak nőstény egyedek keljenek ki a lerakott petecsomókból (Fountain & Hopkin, 2005). Apró, fehér állatok, hasi oldalukon ugróvillával, amit ha hátracsapnak, felpattannak a levegőbe. Leginkább erdei talajban élnek, hasi tömlővel lélegeznek, ami miatt a talajgözökre érzékenyek. Epimorfózissal (kifejléssel) szaporodnak, alacsony nedvességtartalomnál a peték kiszáradhatnak. Megfelelő nedvességtartalmú, 20 °C-os környezetben 10-15 nap alatt kelnek ki, majd további 10-15 nap alatt válnak ivaréretté.

1.2.3.4. Nano cink-oxid hatása az ugróvillásokra

Idestova négy évtizede alkalmazzák az ugróvillásokat ökotoxikológiai tesztorganizmusként (Fountain & Hopkin, 2001; Krogh, 2008). Az ugróvillásokon leggyakrabban tesztelt nanoanyag a nZnO (3. táblázat). Ez főként annak tulajdonítható, hogy a nZnO közvetlenül és közvetett módon is belekerülhet a talajba. Kool et al. (2011; 2012, 2013) részletekbe menően vizsgálta ennek az anyagnak a hatását a *Folsomia candida* fajra. Először krónikus toxicitási teszteket végeztek természetes talajban, nano és nagyszemcsés ZnO hatását kutatva. Ezen vizsgálatok során arra a következtetésre jutottak, hogy főképp a kioldódott cink ionok toxikus hatása befolyásolja a túlélést és a reprodukciót, nem pedig az anyag szemcsemérete (Kool et al., 2011). A továbbiakban arra a kérdésre próbáltak választ találni, hogy az oldatok különböző módokon történő kijuttatása befolyásolja-e a toxicitást. Két szemcseméretet és két különböző módszert (száraz por állagú és talaj oldatba kevert nano, illetve nagyszemcsés ZnO) vizsgáltak. Sem a részecskeméretnek, sem az eltérő expozíciós módnak nem volt befolyása a ZnO toxicitására (Waalewijn-Kool et al., 2012). Ezek után a felületkezelt és a nem felületkezelt nZnO hatását vizsgálták. Ezeket a teszteket egy előre elkészített és különböző ideig inkubált talaj és oldat keverékekben végezték el. Kiindulásként 0, 3, 6 és 12 hónapos talajból vettek mintát és arra helyezték a tesztegységeket. Az első vizsgálat során a felületkezelt anyag bizonyult toxikusabbnak, bár mindkét anyag toxikus volt. A 3 hónapos talajnál már a nem kezelt nZnO toxicitása erősen csökkent, viszont a felületkezelt anyag csak 12 hónap után mutatott hasonló csökkenést a toxicitásban (Waalewijn-Kool et al., 2013). Manzo et al. (2011) nem csak a toxicitást és a reprodukcióra kifejtett hatást, hanem az elkerülést is vizsgálták. A krónikus tesztnél nemhogy toxikus hatást, hanem inkább biostimulációt tapasztaltak (106%), ez főképp az alkalmazott alacsony koncentrációnak volt köszönhető (230 mg/kg), hiszen a Zn esszenciális elem. A nZnO-nál 16%-os, a ZnCl₂-nál 76%-os elkerülést tapasztaltak.

3. táblázat. Különböző szemcseméretű ZnO fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint toxicitása a *Folsomia candida* ugróvillás fajra

Anyag származása	Részecske nagyság	Vizsgálati idő	Hatás**		Referencia
	nm		LC ₅₀	EC ₅₀	
BASF	<200	28 nap	>3086	1964	(Kool et al., 2011)
Micronisers	30 ----- 200	28 nap	n.h.	P: 3159 T:3593 ----- P:2914 T:5633	(Waalewijn-Kool et al., 2012)
BASF	<200	28 nap	n.h.	0 hó: 873 3 hó:749 6 hó:579 12 hó:1817 ----- 0 hó:1964 3 hó:2847 6 hó:- 12 hó: >5855	(Waalewijn-Kool et al., 2013)
Sigma-Aldrich	<100	28 nap	n.h. (230 konc.)		(Manzo et al., 2011)

Megjegyzés: * *FZnO*: felületkezelt ZnO, *ZnO gipsz*: gipsz közegben tesztelt ZnO, *ZnO talaj*: talaj közegben tesztelt ZnO; ***LC*₅₀, *EC*₅₀: mg/kg; *n.h.*: nincs hatás; *n.a.*: nincs adat; *P*: por állagú kijuttatás; *T*: talajoldatba kevert hatóanyag; *mort*: mortalitás.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Tesztanyagok és előkészítésük

Vizsgálataim során két különböző szemcseméretű ZnO-dal dolgoztam (Gyártó: US Research Nanomaterials, Inc., Houston, TX Amerikai Egyesült Államok). A gyártó által meghatározott adatok szerint 10-20 nm (átlagosan 15 nm) 99 + % tisztaságú és 80-200 nm (átlagosan 140 nm) 99 + % tisztaságú részecskéket tartalmaznak. A dolgozatban a gyártó által megadott átlagos méreteket tüntetem fel. Mindkét anyag az úgynevezett nedves kémiai módszerrel készült és nem alkalmaztak rajtuk felületkezelést. A méreten kívül morfológia tekintetében is különböznek: a kisebb gömb alakú, míg a nagyobb irreguláris részecskéket tartalmaz. A 15 nm-es 20-60 m²/g, a 140 nm-es pedig 4,8-6,8 m²/g fajlagos felülettel rendelkezik. A kioldódott ionok hatásának megfelelő vizsgálatához ionos kontrollként ZnCl₂-ot használtam, a mitigációs vizsgálatokhoz pedig N-acetilciszteint (Gyártó: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország).

A tesztoldatokat a baktériumközösségekkel és a fonálférgekkel végzett vizsgálatok esetében Milli-Q vízzel, míg az ugróvillásokkal végzett vizsgálatok esetében desztillált vízzel készítettem el. A törzsoldat koncentrációk kísérletenként változóak voltak. A törzsoldatokat minden vizsgálat előtt 20 percig szonikáltam (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany, 37 kHz, 560 W, Singen, Németország), hogy biztosítsam a megfelelő diszpergációt. Ezután elkészítettem az adott koncentrációsorozatokat és késedelem nélkül a tesztrendszerhez adtam a megfelelő oldatokat. A tesztközegek hatását célzó vizsgálatoknál ezután pH mérés történt. Az adott kísérleti csoportokhoz tartozó koncentrációkat szakirodalmi adatok és/vagy a becsült környezeti koncentrációk alapján határoztam meg.

2.2. Pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálatok

Bár a gyártó biztosított számunkra méretkategóriákat, ezzel együtt is a részecskék adott tulajdonságainak vizsgálata, újbóli ellenőrzése rendkívül fontos a kísérletek összehasonlíthatósága és reprodukálhatósága szempontjából. Főleg, mert a nanoanyagok – köztük a nZnO is – folyamatos változásban vannak, így nagyobb különbségek is keletkezhetnek a gyártó által megadott és a mért adatok között. A karakterizációs eljárások szükségességét a *1.2.1.1. Tesztelési és alkalmazási problémák* c. fejezetben fejtem ki bővebben. Az általunk felhasznált anyagok vizsgálatára több módszert is alkalmaztunk. A részecske-méreteloszlási és morfológiai mutatók ellenőrzését minden kísérletcsoport előtt pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM, FEI Quanta 3D, ELTE) végeztem el. A mérések az ELTE Természettudományi Kar Központi Kutató és Műszer Centrum SEM laborjában történtek Dr. Dankházi Zoltán közreműködésével. Az ott használt pásztázó

elektronmikroszkóp egy nagyfelbontású kétsugaras készülék, tehát rendelkezik elektron- és ionforrással is. Az én esetemben az elektronforrás került felhasználásra. A SEM kép a minta felületből kiváló „termékek” avagy szekunder elektronok, a nyaláb elektronjai közül nagyszögben szóródó visszaszórt elektronok, illetve a mintából kiváló röntgen fotonok pásztázása során alakul ki. A detektorok által összegyűjtött termékek kiváltott energiája különböző, ezért mind felületközeli tartományból, mind különböző mélységekből is képes a képalkotásra. A szekunder elektronok segítségével felületi, a visszaszórt elektronokkal mélységi képet tudunk létrehozni a vizsgált anyagról. Az atom összetételről pedig röntgen fotonok segítségével kaphatunk információt. A méréseim során a felületi információkra voltam kíváncsi, így a szekunder elektronok begyűjtése történt meg a detektorok segítségével. A SEM méréseknél problémát jelenthet az elektronnyalábból származó töltés lerakódása a minta felületére. Nanoanyagokat vizsgáltam, ezért nem lehetett a hagyományos módszert használni ennek elkerüléséhez (vékony aranyréteg rápárolgatása a mintára), mivel az lényegesen módosította volna a részecskék tulajdonságait. Így a Quanta 3D mikroszkóp alacsony vákuumos üzemmódját használtam, mert a gázos környezet képes a felületi töltések semlegesítésére.

A mintákat kísérletenként eltérően készítettem elő. A baktériumközösségi vizsgálatok előtt készítettem a 15 nm és a 140 nm ZnO-ból egy-egy Milli-Q vizes (10,04 mg/l Zn) szuszpenziót, a közegek hatását célzó vizsgálatoknál mindkét anyagból egy-egy talajoldatos (1028 mg/l Zn) szuszpenziót. A Milli-Q vizes szuszpenzió 24 órás, míg a talajoldatos 48 órás inkubáció után került vizsgálatra. A koncentrációkat és az inkubációs időt a fonálféreg előtesztek Milli-Q vizes és talajoldatos vizsgálati alapján állítottam be. 10,04 mg/l Zn koncentrációt alkalmaztam, mivel az volt a legmagasabb Milli-Q vizes koncentráció. Ezzel ellentétben a talajoldatos vizsgálatok előtt a legalacsonyabb, 1028 mg/l Zn koncentrációt vizsgáltam a legmagasabb (16454 mg/l Zn) helyett, mivel úgy ítélt meg, hogy magasabb koncentrációban már nem lehetne megfelelően vizsgálni a talajszemcsék és az anyag kapcsolatát, ugyanis a részecskék nagy valószínűség szerint teljesen befednék a szemcséket. A mintákból kézi felkeverés után műanyag pipettával egy cseppet tettem a grafit hordozó anyagra, majd 10-15 perc száradást követően helyeztük a mikroszkópba, ahol az alacsony vákuumos üzemmód bekapcsolása után elkezdtem a minták pásztázását. Az elektron energia megfelelő beállítása után több képet is készítettem a mintákról. A legnagyobb alkalmazott felbontás 20 μm , a legkisebb pedig 400 nm volt. A mitigációs kísérletek előtt megvizsgáltam a két anyag 50-50%-os keverékét önmagában és minden anyag (15 nm, 140 nm és a keverék) N-acetilciszetines (NAC) oldata is feltérképezésre került. Az oldatok ebben az esetben Milli-Q vizesközegben készültek (10,04 mg/l Zn) és 24 óra állás után mértem meg őket. A NAC-os oldatok a toxicitási teszthez hasonlóan készültek el, 160 μl oldat, plusz 160 μl 10 mg/l NAC felhasználásával, így elérve a végső 5 mg/l-es NAC koncentrációt. A minták gépbe vitele az előző

kísérlethez hasonlóan történt. Ennél a kísérletnél a legnagyobb felbontás 30 μm , a legkisebb 500 nm volt. A készült képek alapján mindkét kísérletnél meghatároztam az átlagos méretet és a méreteloszlást. A mérést Image J szoftver segítségével végeztem.

2.3. Cink kioldódás mérés

A kioldódott komplex cink mennyiségét minden kísérleti tényező esetében megvizsgáltam a Szent István Egyetem Kémiai Tanszékének munkatársa, Dr. Horváth Márk Kálmán segítségével. A 15 és a 140 nm-es anyagot két időpontban (24, 48 óra) vizsgáltuk, Milli-Q vízben és talajoldatban, majd a mitigációs kísérletek során ismét Milli-Q vizes közegben, önmagukban, a két anyag keverékeként és mindhárom esetben NAC hozzáadásával is. A fonálféreg Milli-Q vizes kísérleteknél használt legmagasabb koncentrációt vizsgáltuk minden alkalommal (10,04 mg/l Zn). Ennek keretében 5 ml törzsoldatot 30 percig centrifugáltam 7500 rpm-en, hogy elválasszam a mintától a leülepedett és az aggregálódott szemcséket. A felülúszóban ezután induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria (ICP-OES, Horiba Jobin–Yvon Activa-M, SZIE) segítségével megmértük az oldott Zn mennyiségét (Liu et al., 2017; Ma et al., 2014). Ez egy emissziós spektroszkópai módszer, ahol induktív csatolású plazma segítségével állítják elő a gerjesztett atomokat és ionokat. Ezek egy adott kémiai elemre jellemző hullámhosszúságú elektromágneses sugárzást bocsájtanak ki. A sugárzás intenzitása korrelál a vizsgált mintában előforduló elem koncentrációjával (Olesik, 1991).

2.4. Baktériumközösség vizsgálatok különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

2.4.1. Talajminták gyűjtése és előkészítése

A talaj mikroflóra mérgező hatásokkal szembeni érzékenységének vizsgálatára az Interdiszciplináris tudományok kutatási laborjában az Okayama Egyetemen (Okayama, Japán) volt lehetőségem egy két hónapig tartó vizsgálatorozat alatt. Két eltérő szerves anyag tartalmú mintaterületet választottam: az andosol talajtípussal jellemezhető Hiruzen erdőből (Tottori prefektúra, Japán) és a cambisol talajú Wakasugi erdőből (Okayama prefektúra, Japán) gyűjtöttük a mintákat. Az erdőkön belüli mintavételi helyet az ottani segítőm, Dr. Fujio Hyodo jelölte ki, előzetes vizsgálatok alapján. A vizsgálatok elvégzését is ő koordinálta. Mindkét erdőből 10 különböző talajmintát vettem, egymástól 10-20 cm-es távolságban. A 10 mintát egybekevertem és 2 mm-es lyuk átmérőjű szitán átszűrtem. Így 577,32 g Wakasugi-i és 592,05 g Hiruzeni-i talajt kaptunk (talaj + zacskó tömege). Ezután 6x~10 g talajt mindkét típusból elkülönítettem vízkapacitás (WHC) mérésre. Három ~10 g-os mintát 105 °C-on egy éjszaka alatt kiszáritottam és szárítás után megmértem. A másik három mintát filter papírral kibélelt tölcsérbe helyeztem és

vízzel teljesen beprióttam. A tölcser alján lévő csepegés megszűnése után lemértem a mintákat és még kétszer megismételtem a vízzel borítást és a mérést. A három mérésből átlagot számoltam. A szárított minták alapján meg tudtam határozni a gyűjtött talaj maximális vízkapacitását és ennek valamint a vízzel borított mintáknak a segítségével pedig a víz kapacitását. A kísérlet alatt a WHC 60%-ra szerettem volna beállítani, így az előzetesen kiszámolt értékek alapján megállapítottam, hogy mennyi vizet kell hozzáadni vagy esetlegesen mennyire kell szárítani az adott talajmintákat a 60% eléréséhez, figyelembe véve a hozzáadni kívánt szuszpenziókat is.

2.4.2. Foszfolipidzsírsav (PLFA) analízis: teljes biomassza mérés

A talaj biomassza tömegének mérésére kiváló módszer a foszfolipidzsírsav (PLFA) analízis. A foszfolipidek poláris szerves vegyületek, alkotóelemei a zsíroknak. Önmagukban nem raktározódnak a talajban vagy elhalt sejtekben, csak az élő sejtek membránjában találhatóak meg (Zelles, 1999). Így a talaj foszfolipid tartalma arányos a talajban található biomassza tömegével. Faj szintű meghatározásra nem alkalmas, közösségszerkezeti változásokat viszont jól lehet a módszer segítségével vizsgálni. Az analízis során különböző foszfolipideket mértem a talaj mikroflóra különböző egységeit reprezentálva (Bardgett et al., 1996; Frostegard et al., 1991; Halbritter & Mogyoróssy, 2002; Wardle et al., 2011; Zelles, 1999). A totális baktérium biomasszát a i15:0, α 15:0, 15:0, i16:0, i17:0, cys17:0, 17:0, cys18:1w7, és cys19:0 foszfolipidekkel, a jelenlévő gombákat pedig a cys18:2w6 foszfolipiddel reprezentáltam. A cys18:2w6/baktPLFA arányával mutattam be a gomba:baktérium arányt a mintákban (Bardgett et al., 1996).

A kísérlethez az ugróvillás közegeket vizsgáló tesztknél felhasznált három legalacsonyabb koncentrációval dolgoztam (160,69; 321,37 és 624,75 mg/kg Zn, megfelelően 200, 400 és 800 mg/kg ZnO-nak), három ismétlésben és egy negatív kontroll csoportot is vizsgáltam, hat ismétlésben. A talajok vízkapacitásának megmérése után meghatároztam, hogy az összesen vizsgált 24 db mintához hány gramm talaj és hány ml oldat szükséges, hogyha 3 g száraz talajt szeretnék mintánként felhasználni. Ezek alapján a Hiruzen minta esetében minden ismétlésben 6,83 g talajt mértem ki és 0,5 ml oldatot adtam hozzá. A Wakasuginál szárításra volt szükség, hogy elérjem a kívánt kapacitást, így a kimért 9,04 g talajmintákat 7,99 g-ra kellett szárítanom, hogy ugyanúgy 0,5 ml oldattal tudjam nedvesíteni őket. A minták kimérése után mindegyik ismétlés tömegét feljegyeztem, hogy hetente kétszer ellenőrizni és pótolni tudjam a csökkent folyadék mennyiséget. A 24 db minta mellett készítettem 2 db-ot referencia értéknek, amik nem kerültek az inkubátorba, hanem a mélyhűtőbe helyeztem őket. 30 napos inkubáció (22°C) után a kísérlet bontását 2 óra -30 °C-os fagyasztással kezdtem, majd a mintákat áthelyeztem - 80 °C-os fagyasztó szárítóba az elkövetkező két napra. Ezek után naponta 12 mintát vizsgálva elkezdtem a PFL

analízist. A módszert Frostegard et al. (Frostegard et al., 1991) munkája alapján végeztem el. A foszfolipid kivonás előtt a mintákat homogenizáltam és 1,5 g-nyi mennyiséget üvegcsövekbe osztottam szét. A minták megfelelő előkészítése után kloroform (neutrális lipidek eltávolítása) és acetone (glikolipidek eltávolítása) hozzáadásával eltávolítottam a számomra szükségtelen lipideket. Majd új üvegcsében metanol segítségével kivontam a foszfolipideket. A mintákat szárítás után ismét fagyasztoába helyeztem (- 20 °C) és másnap előkészítettem őket a gázkromatográffal történő méréshez.

2.5. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

2.5.1. Tesztközegek elkészítése

Négy különböző tesztközeget a használtam fel a kísérletekben. Milli-Q vizet (pH ~ 6) és talajoldatot (pH ~ 7,5) a *P. redivivus*, gipszet és mesterséges talajt az *F. candida* esetében. Tiszta vizet a Milli-Q Direct 16 géppel (Millipore, Németország) készítettük (vezetőképesség: 20–35 IS cm⁻¹; TOC 1–3 ppb). A talajoldathoz a talajt Dr. Nagy Péter István segítségével, Budapest II. kerületéből (Hűvösvölgy) gyűjtöttem be. A barna erdőtalajt 20-40 cm mélységből, egy cseresznyefa gyökérzónájához közel (*Prunus cerasus L.*) vételeztük, hasonlóan Sávoly et al. (Sávoly et al., 2012) vizsgálataihoz. A talajmintákat műanyag tárolóban a laboratóriumba szállítottam és felhasználás előtt a talajt hűtőszekrényben tároltam (4 °C). Nedvességtartalomtól függően előnedvesítés történt és 1-2 nap inkubáció után műanyag centrifugacsövekbe porcióztam a mintát. Az oldat kinyeréséhez 20 g talajt mértem ki csövenként. Ezután 12-14 000 fordulat/perc fordulatszámom 20 percig centrifugáltam a talajmintákat (Janetzki T24 Lipcse, Németország), majd a minták tetejére összegyűlt nedvességet összegyűjtöttem és ezt használtam fel a tesztek során. A talajoldat kémiai és fizikai tulajdonságainak vizsgálatát Sávoly et al. (Sávoly et al., 2016) végezte el. A gipszet a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszékén a törzstenyészethez használatos recept alapján készítettem el: 200 g gipsz, 200 g víz, 10 g aktív szén összekeverésével és műanyag Petri csészékbe való kihelyezéssel. A mesterséges talajt (pH:7,5) az OECD 232-es szabvány alapján készítettem el (5% tőzeg, 20% kaolin, ~74% homok, <1% kalcium karbonát).

2.5.2. *Panagrellus redivivus* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek

Kíséréteimhez a *P. redivivus* tesztfaajt választottam a mikrofauna reprezentálására. Tartásuk a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék laboratóriumában zabpelyhes táptalajon, sötét termosztátban 20 ± 1 °C történik (TS606-CZ/4-WAR, Németország). Kifejlett nőtény egyedekkel dolgoztam két különböző teszt közeget (Milli-Q víz és talajoldat)

felhasználva. Az expozíciós időt kivéve (Milli-Q víz – 24 óra; talajoldat – 48 óra) a tesztek beállítása ugyanúgy történt (4. táblázat). A talajoldatos tesztnél 24 óra alatt nem tapasztaltam mérhető hatást, így vált indokolttá a hosszabbított expozíciós idő. Mivel a teszt nem szabványosított ökotoxikológiai teszt, az érvényességi küszöböt irodalmi adatok alapján úgy határoztam meg, hogy a kontroll csoportban a maximális elhullás nem lehet több 20%-nál (Hrács et al., 2018). A tesztek során etetés nem történt. A két különböző szemcseméretű ZnO-ból és a ZnCl₂-ből törzsoldatokat készítettem, majd 20 perc szonikálás után megalkottam a kísérleteknél felhasznált koncentráció sorozatokat. A végleges koncentrációk 0,32; 0,63; 1,26; 2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn voltak a Milli-Q víz esetében, megfelelően a 0,39; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5 mg/l ZnO-nak és 0,65; 1,31; 2,61; 5,23; 10,46 és 20,92 mg/l ZnCl₂-nak. A koncentrációkat Ma et al. (Ma et al., 2011) vizsgálatai alapján állítottam be. Ők kísérletükben már az általuk használt legalacsonyabb koncentrációban (4 mg/l) is tapasztaltak mortalitást, így a környezeti koncentrációkhoz közelítve ennél alacsonyabb értékeket is tartalmazó koncentráció sort szerettem volna felállítani. A talajoldattal végzett kísérleteknél előtesztek alapján kitapasztalt magasabb koncentrációkat használtam (1028,4; 2056,8; 4113,61; 8227,22 és 16454,5 mg/l Zn, megfelelően 1280; 2560; 5120; 10240 és 20480 mg/l ZnO-nak és 2141,72; 4283,44; 8566,88; 17133,77 és 34267,52 mg/l ZnCl₂-nak), mivel ugyanabban a koncentráció tartományban a ZnCl₂ kivételével egyik anyagnál sem tapasztaltam szignifikáns hatást. A koncentrációkat próbáltam közelíteni az ugróvillás tesztekhez alkalmazottakhoz. Koncentrációnként és kontroll (negatív) csoportonként négy ismétlést alkalmaztam. A tesztek 96 lyukú mikrotitráló lemezekre végeztem (Bioster S.p.A., Italy), ismétlésenként 5 db kifejlett nőtényt használtam. A törzstenyészetből egy Milli-Q vizet tartalmazó számláló edénybe helyeztem random mintavétellel egy adag állatot. Innen válogattam ki pipetta segítségével a nőtény egyedeket. Mivel a tenyészetekben lévő állatok 90%-a nőtény, csak arra kellett figyelni, hogy hím állat ne kerüljön a kísérleti rendszerbe. A női ivarnyílás a hasoldal közepvonalaiban, míg a hímivarnyílás a test hátsó végében helyezkedik el, ahol jól kivehető a rövid, hajlított párzótüske. Emellett a hímek általában kisebbek, mint a nőtények. Az állatok behelyezése előtt a nedves környezet megteremtése végett 100 µl Milli-Q vizet vagy talajoldatot pipettáztam a mikrotitráló lemezekre. Ezután, mindkét kísérletnél az állatokkal együtt kétszer 30 µl Milli-Q vizet helyeztem minden felhasználni kívánt küvettába. Mivel a küvettákban már volt folyadék mire az oldatokat hozzáadtam, ezért minden nominális koncentrációnak a dupláját készítettem el a kísérletek előtt. Ezekből 160 µl tesztoldat, vagy a kontroll csoport esetében további Milli-Q víz hozzáadása után végül minden küvettába összesen 320 µl folyadék került. A mikrotitráló lemezeket termosztátban sötét körülmények között, 20 ± 1 °C –on inkubáltam. A teszt végpontja a mortalitás volt, a tesztek leolvasását a Milli-Q vizes közeg esetében transzmissziós sztereomikroszkóp (Olympus SZH 10, Németország) alatt végeztem.

Mivel a talajoldat vizsgálata során jóval magasabb koncentrációkat használtunk, ezért a ZnO részecskék minden esetben vastag réteget képeztek a lyukak alján, megnehezítve az alsó megvilágításban történő leolvasást. Így ezeknél a kísérleteknél felülről világítottam és számoltam meg a mintákban a túlélte egyedeket.

2.5.2.1. Módszerfejlesztés

A Hrács et al. (2018) által kifejlesztett módszerben az állatokat üvegpipettával helyezték a 96 lyukú mikrotitráló lemezekre. Mivel ezt a módszert túlzottan időigényesnek és pontatlannak találtam, áttértem az 5-200 µl-es pipetta használatára. Így az állatokat pontos folyadékmennyiséggel tudtam a kísérleti rendszerbe helyezni és kisebb gyakorlás után maga az áthelyezés is könnyeddé válik, ami nagyon fontos volt nagy egyedszámú kísérletek beállításánál.

2.5.3. *Folsomia candida* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek és expozíciós útvonalak

A mezofaunából a *F. candida* tesztfajt választottam. Hasonlóan a *P. redivivus*-hoz, tartásuk sötét termosztátban (20 ± 1 °C) valósul meg, viszont ebben az esetben a Tanszéken használatos gipsz és aktív szén keverék (200 g gipsz/ 200 g víz/ 10 g aktív szén) szolgál a törzstenyészet táptalajául. Ezeknél a kísérleteknél is két különböző tesztközeggel, a gipsszel és mesterséges talajjal dolgoztam (4. táblázat). A gipsz esetében az OECD 232-es szabvány módosított verzióját használtam fel, Fountain és Hopkin (2001) kísérleteit alapul véve. Előkísérletek alapján a törzstenyészetek talaját biztosító gipsz keverékkel dolgoztam a kísérletben is. Ezt műanyag Petri csészékbe helyeztem bele. A tesztanyagokat a kihelyezett táplálékhoz kevertem hozzá, nem a tesztközeghez, hogy biztosítani tudjam a kizárólagos *per os* expozíciót. Habár a gipsz tesztközegben található aktív szénből részben tudnak fogyasztani az állatok, előkísérletek alapján ezt a keveréket találtam megfelelőnek, Fountain & Hopkin (2001) kísérletéhez hasonlóan. Aktív szén hozzáadása nélküli tenyészetek túlélése csökken, emellett a leolvasást is rendkívül megnehezíti a szén hiánya. A táplálékként használt 0,5 g porélesztőhöz 1,5 ml tesztoldatot adtam és egy filter papíron a gipszes tesztközeg közepére helyeztem. Hetente egy alkalommal cseréltem az oldat-és táplálékkeveréket. A mesterséges talajon lezajlott kísérletet az OECD 232-es szabvány alapján végeztem. Tesztedényenként 25 g talajt és 5 ml oldatot vagy desztillált vizet (kontroll csoport) alkalmaztam. Mindkét vizsgálatnál azonos koncentrációkat használtam: 160,69; 321,37; 624,75; 1285,5 and 2571 mg/kg Zn. Ezek a koncentrációk megfelelnek 803,44; 1606,87; 3213,75; 6427,5 and 12855 mg/l Zn-nek, abban az esetben, ha a talajhoz és 3213,75; 6427,5; 12855; 25710 and 51420 mg/l Zn-nek, ha a táplálékhoz adott oldalra számoljuk át őket (ZnO-ra megfeleltetve:

200, 400, 800, 1600 és 3200 mg/kg ZnO, ZnCl₂-ra megfeleltetve: 334,63; 669,25; 1338,5; 2677 és 5354 mg/kg ZnCl₂). A koncentráció sorozatot Kool et al. (Kool et al., 2011; Waalewijn-Kool et al., 2012, 2013) kísérletsorozata alapján állítottam össze. Koncentrációnként négy ismétlést és a kontroll csoportban (negatív) pedig nyolc ismétlést alkalmaztam mindkét vizsgálatnál. A szinkronizált korú állatok a törzstenyészetből leválogatott és elkülönített felnőtt egyedek petéiből származtak. A felnőtteket 2-3 nap után eltávolítottam a szinkrontenyészetekről, hogy azonos korúak legyenek a kísérleti egyedek. Minden tesztedénybe 10 db 10-12 napos egyed került. A kísérleti idő letelte után (28 nap) a leolvasásnál a mesterséges talajos kísérletnél csapvízzel töltöttem meg az edényeket, majd tintával színeztük be, hogy jól láthatóak legyenek az állatok. Ezek után leszámoltam a túlélő adult egyedeket és a szaporulatot. A gipszen végzett tesztnél fényképeket készítettem minden koncentráció minden ismétléséről és Image J szoftver segítségével megszámláltam az adult és a juvenilis egyedeket.

4. táblázat. Tesztközeg vizsgálatok összefoglalása (felhasznált fajok, teszt típusok, közegek, expozíciós utak és idő).

Faj:	<i>P. redivivus</i>		<i>F. candida</i>	
Teszt típus:	Akut mortalitás teszt		Krónikus mortalitás és reprodukciós teszt	
Tesztközeg: Milli-Q víz	Talajoldat		Gipsz	Mesterséges talaj
Teszt idő:	24 óra	24, 48 óra	28 nap	
Oldat helyezés:	Tesztközegben		Táplálékban	Tesztközegben

2.6. Hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata

2.6.1. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *Panagrellus redivivus*-ra

A tesztközegek hatását vizsgáló kísérletek során született eredményekből kiindulva fontosnak találtam a felhasznált anyagok hatásmechanizmusának megismerését célzó kísérletek elvégzését is. A teszteket az általam elvégzett korábbi kísérletek, valamint Ma et al. (Ma et al., 2014) munkája alapján állítottam össze. Ezeknél a vizsgálatoknál már csak a *P. redivivus* tesztfajjal dolgoztam, a gyorsan elvégezhető, könnyen magyarázható eredményeket hozó kísérleti módszer miatt. A tesztidő 24 óra volt. A felhasznált koncentrációk majdnem minden esetben – kivéve az ionos cinkformánál – megegyeztek a Milli-Q vizes közegben végzett tesztekével (0,32, 0,63; 1,26; 2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn). A ZnCl₂ koncentrációkat az általam előre lemért kioldódott cink mennyiségek átlaga alapján határoztam meg (0,13; 0,26; 0,53; 1,06; 2,12 és 4,23 mg/l Zn). Minden koncentrációban és a kontroll csoportban is négy ismétlést alkalmaztam, ismétlésenként 5-5 állattal. Beállítottam egy negatív kontrollt (320 µl Milli-Q víz) és egy NAC-t

tartalmazó kontrollt is (160 µl Milli-Q víz és 160 µl NAC). A 24 órás termosztátban töltött (sötét, 20 ± 1 °C) expozíciós idő után sztereomikroszkóp alatt vizsgáltam meg a túlélő egyedek számát. A kísérleteket elvégeztem a 15 és 140 nm szemcseméretű ZnO és ZnCl₂ alkalmazásával önmagukban és egy mitigáló ágens részvételével is. Az egyes toxikus hatások (például ROS termelődés és/vagy oldott cink ionok hatása) mitigálására az N-acetylcisztein antioxidánst használtam fel. A NAC célja a kísérletekben a toxikus hatások csökkentése és ezáltal az ebben rejülő különbségek kiemelése volt. 10 mg/l-es koncentrációban törzsoldatot készítettem, majd ebből minden felhasználandó küvetába 100 µl-t pipettáztam. A mitigációs kísérletek esetében a törzstenyészetből kiemelt állatokat nem Milli-Q vízbe, hanem a 10 mg/l-es NAC oldatba helyeztem és innen történt a kiválogatásuk kétszer 30 µl vagy egyszer 60 µl folyadék kíséretében. Az összes állat kiválogatása után, a 2.5.2. *Panagrellus redivivus* tesztek c. fejezetben leírtakhoz hasonlóan 160 µl oldatot adtam minden lyukhoz, így elérve a végső 5 mg/l-es NAC koncentrációt.

2.6.2. Nano és nagyszemcsés cink-oxid közötti interakció tesztelése

Az anyagok közötti interakciót vizsgáló kísérletek során is *P. redivivus* akut mortalitási tesztet végeztem. A 15 nm és a 140 nm ZnO 50-50%-os keverékéből alkottam meg a felhasznált koncentráció sorozatot. A kísérlet a 2.5.2. *Panagrellus redivivus* tesztek c. fejezetben leírt Milli-Q vizes kísérletek és a 2.6. *Mitigációs vizsgálatok* c. fejezet szerint történt. Az előkísérletek során csak a három legmagasabb koncentrációban teszteltem (2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn) önmagában és NAC hozzáadásával a keveréket, hogy megnézzem van-e értékelhető eredmény. Miután kétszeri ismétlés során is erős eltérés mutatkozott a keverék és az önálló anyagok toxicitása között, főleg a NAC hozzáadásával, megismételtem az egész kísérletet a teljes koncentráció sorozatot felhasználva (0,32, 0,63; 1,26; 2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn). 24 óra termosztátos inkubáció után sztereomikroszkóp alatt vizsgáltam meg az állatok reakcióját a felhasznált anyagokra. Negatív kontrollként Milli-Q vizet használtam.

2.6.3. Sejten belüli reaktív oxigén gyök termelődés mérése

A sejten belüli reaktív oxigéngyök termelődést aminofenil-fluoreszcein (APF, A36003, Thermo-Fischer, Németország) tesztel mértém a Szent István Egyetem Környezetbiztonsági Tanszékének munkatársa, Dr. Ács András segítségével. Az APF egy viszonylag új, az eddig használt festékeknél (mint pl.: a 2',7'-diklorodi-hidrofluoreszcein diacetát) specifikusabb és stabilabb indikátor a ROS méréshez. A fény által indukált oxidációt jobban tűri és leginkább hidroxil gyök (OH·), preoxinitrit anion (ONOO⁻) és hipoklorit anion (OCl⁻) jelenlétében válik fluoreszcensé (Nagano, 2009). Az APF háromszor erősebben reagál a hidroxil gyökre, mint egyéb

ROS gyökökre pl.: szuperoxidra ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrogén-peroxidra (H_2O_2) és a szingulett oxigénre (O^1_2) (Setsukinai et al., 2003). Sok vizsgálat született arra vonatkozóan, hogy a nanofém-oxidok fotokatalitikus és antibakteriális tulajdonságai főképp a szabad és felülethez kötött hidroxil gyököknek köszönhetőek, habár a szuperoxid és a hidrogén-peroxid is nagy szerepet játszik a folyamatok során (Ma et al., 2013). Így feltételezhetjük, hogy az $\text{OH}\cdot$ termelődése reprezentatív a totális ROS képződésre nano ZnO hatására. APF-el végzett mérések száma jóval alacsonyabb (Cohn et al., 2009; Saito et al., 2015), konkrét vizsgálatot sejten belüli ROS termelődés mérésére nZnO hatására nem is találtam.

Nincs szabvány módszer a sejten belüli ROS méréshez APF használatával, így egyéb mérési módszerek és protokollok fejlesztésével dolgoztam ki az általam használtat (Sarasija & Norman, 2018; Wang et al., 2018; Yoon et al., 2018). A mérés beállítása a fonálféreg toxicitási tesztekéhez hasonlóan történt, kivéve, hogy csak 3 órás expozíciónak voltak kitéve az állatok a három legmagasabb koncentrációban (2,51; 5,02 and 10,04 mg/l Zn), koncentrációnként 8 ismétlésben. A három legmagasabb koncentráció kiválasztása mögött az állt, hogy ezeknél már feltételezhetően mérhető mennyiségű ROS termelődés történik. Az expozíciós időt előkísérletek alapján állítottam be, mivel 24 óra után ezekben a koncentrációkban már nagyarányú az elhullás, 3; 5 és 6 órás expozíciót vizsgáltam. Ezekből megmutatkozott, hogy nincs szignifikáns eltérés az időpontok között, így technikai szempontból a 3 órás expozíciót választottam. Emellett a 96 lyukú mikrotitráló lemez helyett 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztem az állatokat, hogy megfelelően kinyerhetőek legyenek az expozíciós idő leteltével. A három órás termosztátos inkubálás után (20 ± 1 °C) az egy kezeléshez tartozó ismétléseket egy Eppendorf csőbe csoportosítottam (40 állat/cső). A csövekben az állatokat 1,5 ml foszfátsó pufferrel (PBS, pH 7.2) átmostam. Ezt 5 percig tartó 600 g centrifugálás után (MiniSpin, Eppendorf A6 22331, Hamburg, Németország) az állatokkal együtt átpipettáztam egy számláló edénybe és onnan sztereomikroszkóp segítségével, 80 μl folyadékkal együtt egy következő Eppendorf csőbe helyeztem át. A kísérlet előtt elkészített APF törzsoldatból (10 μM PBS-ben) 160 μl került mindegyik kezeléshez. Majd 2 perc homogenizálást követően (Qiagen Tissuelyser LT homo, Hilden, Németország), újra centrifugába raktam őket (Qhaus Fe5718R, Németország). Itt 12 perc alatt 17 000 g-n megtörtént a lizátum és a pellet elválasztása egymástól. A felülúszóból kezeléenként 2 párhuzamost készítve 75 μl -t pipettáztam egy 96 lyukú fekete mikrotitráló lemez küvettáiba. Küvettánként 100 μl -re egészítettem ki a mintákat PBS-t hozzáadva. A vakhoz (50 μl PBS) és a pozitív kontrollhoz (50 μl H_2O_2 50 mM) 50 μl -nyi APF törzsoldatot adtam hozzá. Annak ellenére, hogy az oldatban csak torma-peroxidáz (HRP) jelenlétében kellene reagálnia az APF-nek a H_2O_2 -ra, molekuláris oxigén hatására a H_2O_2 bomlani kezd és így már az APF-el is reakcióba kerülhet. Mivel nincs szignifikáns eltérés a HRP által kiváltott és az oxigén hatására történő fluoreszcencia között, így megfelelően

használható pozitív kontrollként (Cohn et al., 2009). 30 perc inkubáció után (sötétben, 37 °C-on) 490 nm/515 nm hullámhosszon mikroplate olvasóban megmértem a kibocsájtott fluoreszcenciát (Thermo Scientific Varioskan Lux, Németország). Ugyancsak két párhuzamosban 30 µl mintából Bradford reagens (Bradford Reagent Sigma, B6916-500 ml, Németország) segítségével fehérje mérés történt.

2.6.3.1. Módszerfejlesztés

A protokollok alapján összerakott módszer nem volt működőképes. Sarasija & Norman (2018), valamint Yoon (2018) 5-20 kifejlett fonálféregből javasolják a lizátum készítését. Tapasztalataim alapján ez a mennyiség sem a fluoreszcencia mérésre, sem a fehérje mérésre nem volt elég, így 40-re emeltem a darabszámot. Emellett Sarasija & Norman (2018) az állatok mosásnál a felülúszó eltávolítását javasolja úgy, hogy az állatokkal együtt 100 µl folyadék maradjon a csövekben. Ez nem kivitelezhető, hiszen nem lehet pontosan meghatározni az Eppendorf csőben maradó folyadék mennyiségét, emellett hiába ülepednek le az állatok a cső aljára, ilyen kis mennyiségnél elkerülhetetlen, hogy a pipettába kerüljenek. Yoon et al. (2018) ezzel szemben már kivitelezhetőbb módszert ajánl, az állatok üveg tárgylemezre való kipipettázásával, viszont az általuk javasolt 10 µl-nyi folyadékmennyiség nagyon alacsony az én kísérleteimben használt 40 állathoz. Így saját tapasztalat alapján 80 µl folyadék felhasználásával tudom az állatokat áthelyezni. Mindkét protokoll, továbbá Wang et al. (2018) is a lizálás után javasolják az indikátor hozzáadását a mintához, tesztjeink során viszont azt tapasztaltuk, hogy túl sok idő telik el a tesztanyaggal történő inkubáció és a mérés között, így a még élő állatok képesek lehetnek lebontani a termelődött reaktív oxigén gyököket. Ezért én rögtön a teszt bontása után hozzáadtam az APF-et és azzal együtt végeztem el a lizálást, így megakadályozva a ROS-ok elbontását. A fejlesztések után használhatóvá vált a módszer, sikeres volt a minták fehérje és fluoreszcencia mérése. A kifejlesztett módszert 6 alkalommal ismételt meg, hogy megbizonyosodjak a működőképességéről.

2.7. Statisztikai kiértékelések

A medián letális és effektív koncentrációkat (LC₅₀, EC₅₀) és a hozzátartozó konfidencia intervallumokat (95% CI) Probit analízissel számoltam a ToxRat program segítségével (Light Version 2.08) (ToxRat®Solutions.Gmbh, 2015). Az eredményeket a Microsoft Excel Solver bővítményével ellenőriztem (Microsoft Corporation, 2010). A statisztikai analízisnél az R Statisztika 3.5.2. programot használtam. Az R-program széles skálájú statisztikai és grafikai technikákat nyújt (R Core Team, 2018). Az R-program segítségével, azoknál a kísérleteknél, ahol

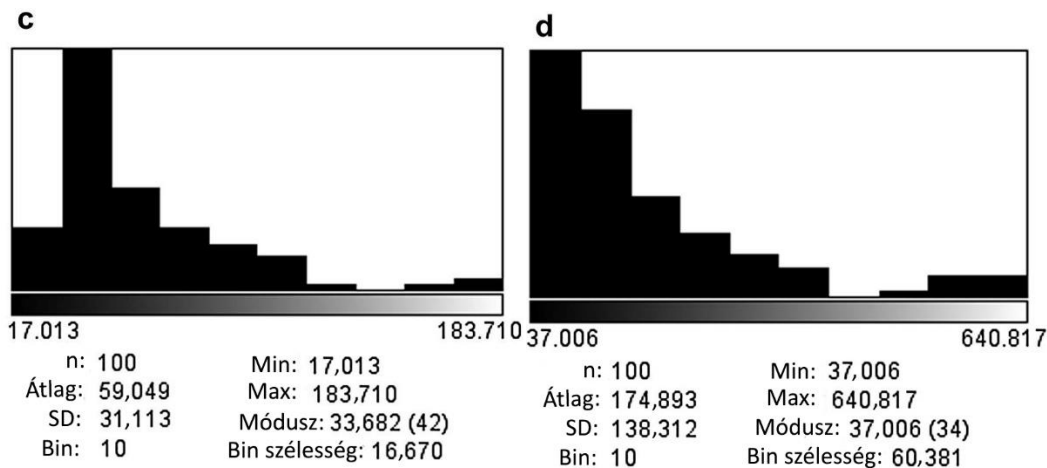
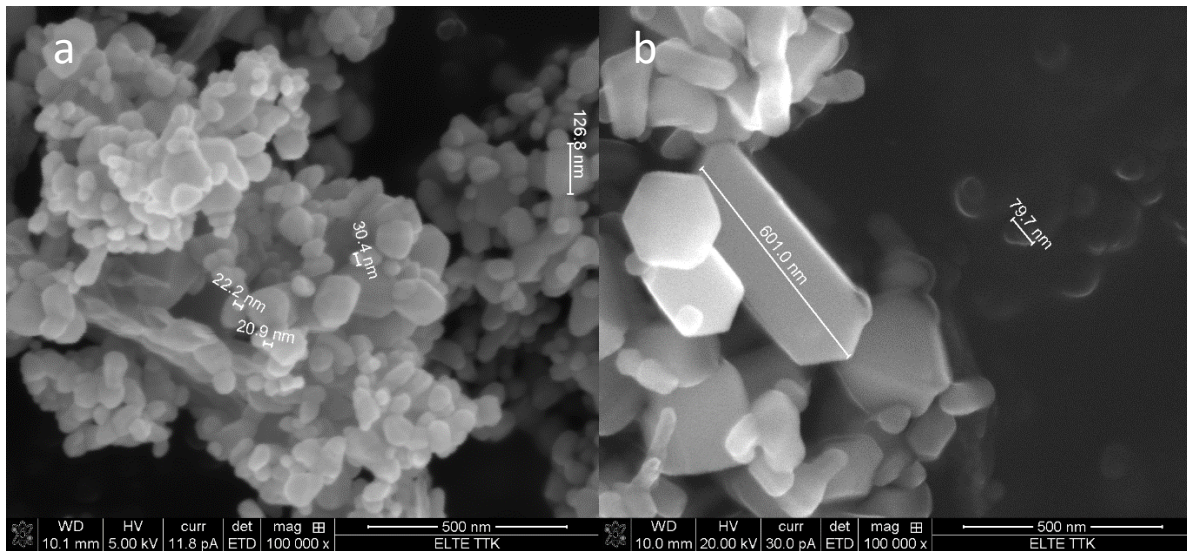
teljesült a feltétel (egyező szórás, normál eloszlás) ott egy utas vagy két utas ANOVA és post hoc tesztként, Tukey tesztet végeztem, ahol ez nem teljesült a koncentrációk kontrollhoz való viszonyának vizsgálatakor lineáris modellt (LM), görbék összehasonlításakor általános legkisebb négyzet elvén működő (Generalized least squares: GLS) technikát és egyes esetekben interakciós lineáris modellt (ILM) alkalmaztam. A GLS modell az egyenlőtlen varianciák esetében is jól használható. A normalitást minden esetben Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztem.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Baktériumközösség vizsgálatok különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

3.1.1. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az átlagos méretet 100 részecske átmérőjének megméréseivel 59 ± 31 és 174 ± 138 (átlag \pm SD, $n = 100$) nm-t számoltam, a névleges 15 és 140 nm átlag részecskemérethez képest (2. ábra a,b). A részecskeeloszlásokból (2. ábra c,d) jól látható, hogy bár kis számban, de a 15 nm-es anyag is tartalmazott nem nano részecskéket és hogy a 140 nm ZnO-ban is bőven találhatunk 30-40 nm-es, de akár 640 nm-es részecskéket is. Viszont az oszlopszélességből kalkulálva, elmondhatjuk, hogy az első anyag több, mint 50%-ban nano-, míg a második több, mint 50 %-ban nagyszemcséket tartalmaz (kb. a részecskék 30%-ka esik a nanotartományba). A 15 nm-es szemcsénél a 34-51 nm-es, a 140 nm-es részecskénél pedig a 37-97 nm tartományba esik a leggyakrabban előforduló részecskeméret.



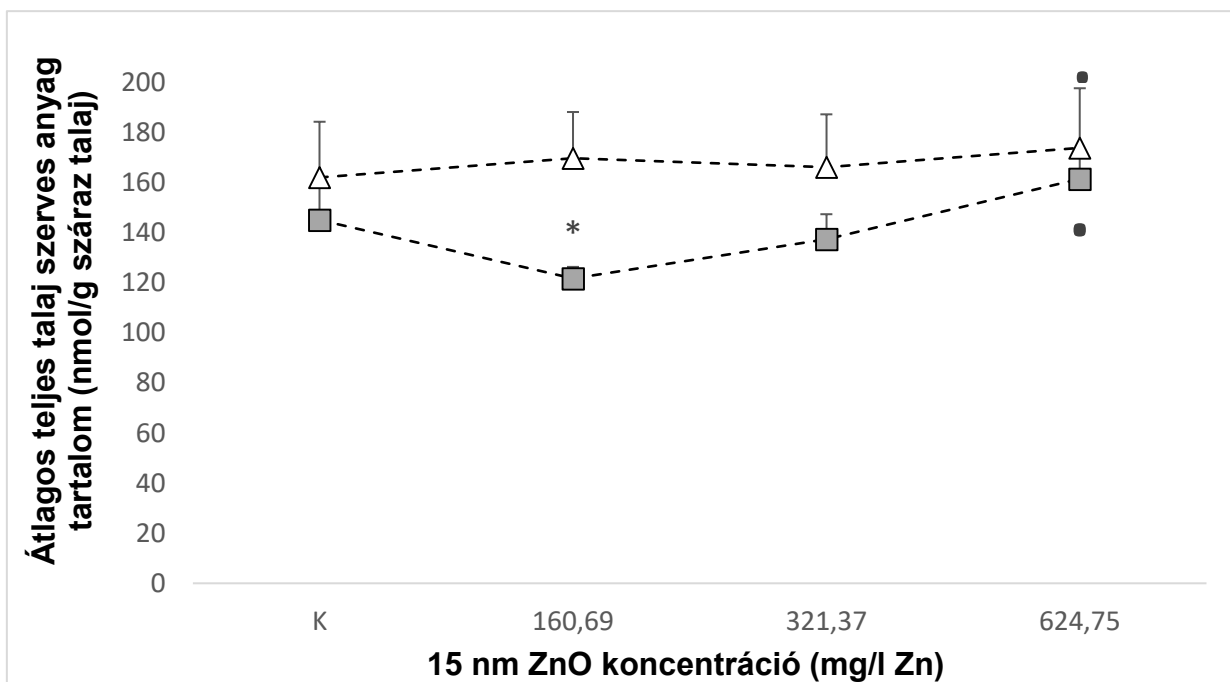
2. ábra: SEM képek és méreteloszlási diagramok a felhasznált ZnO-król: **(a)** 59 ± 31 nm ($n = 100$) becsült méretű (gyártó által megadott méret: 10-30 nm, átlag 15 nm); **(b)** 174 ± 138 nm ($n = 100$) becsült méretű (gyártó által megadott méret: 80-200 nm, átlag 140 nm) és a 15 nm **(c)** és 140 nm **(d)** ZnO méreteloszlása.

3.1.2. Vízkapacitás mérés

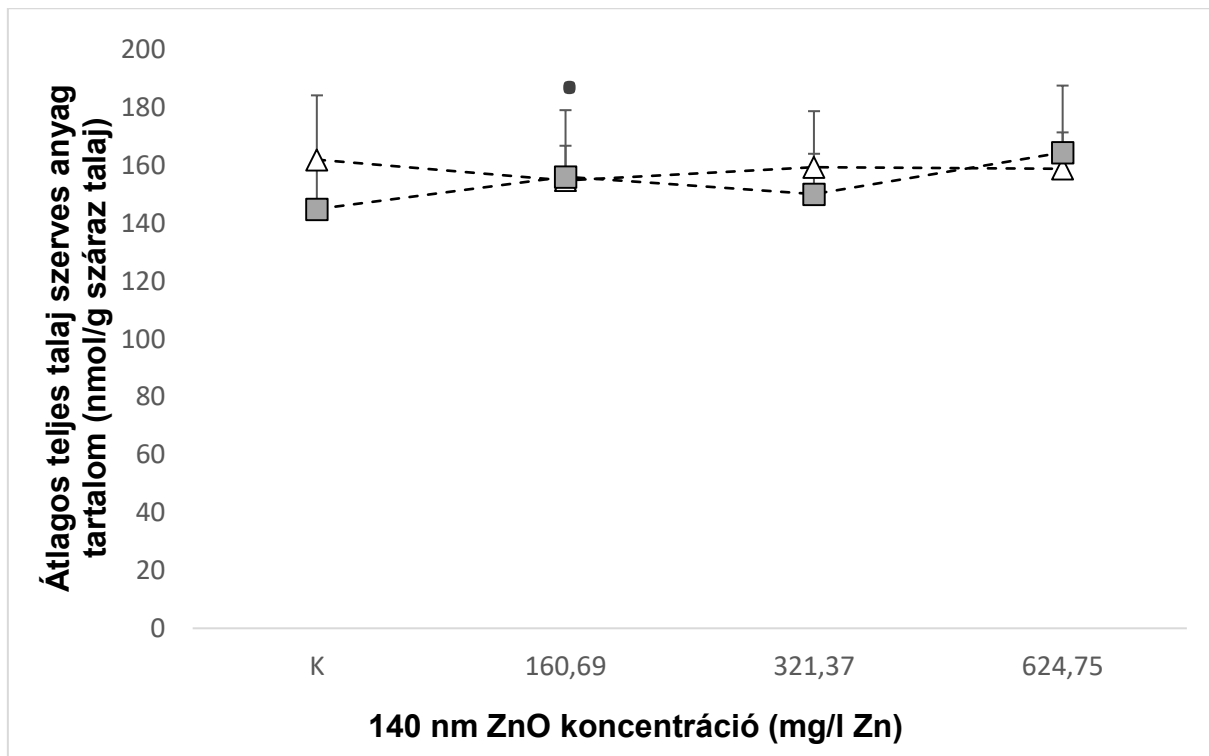
A Japánban két különböző helyről gyűjtött talajminta vizsgálatánál a Hiruzen-i talajminta átlagosan 56,05% a Wakasugi-i talajminta átlagosan 66,81% nedvességet tartalmazott (5. táblázat). A háromszori vízzel felöntés és mérés után ez az érték 70,76%-ra (Hiruzen) és 75,42%-ra (Wakasugi) nőtt. Az ezáltal meghatározott WHC 100% és WHC 60% értékek a 8.2. *További mellékletek* c. fejezet 1. táblázatában láthatóak. Ahhoz, hogy a kísérlet szempontjából előnyös vízkapacitást elérjük (WHC 60%) a Hiruzen-i minták esetében átlagosan 0,53 ml oldatot kellett hozzáadnom a mintákhoz. Ezzel szemben a Wakasugi-i minták esetében szárítás volt szükséges (átlagosan -1,04 g), ahhoz, hogy az oldatok (0,53 ml) hozzáadásával elérjük a 60%-os vízkapacitást.

3.1.3. Foszfolipidzsírsav (PLFA) analízis: teljes biomassza mérés

A két gyűjtött talajminta vizsgálata során a Wakasugi talaj esetében szignifikáns különbség volt a szemcseméret (15 és 140 nm ZnO) hatása között (Kétutas ANOVA: $F_{DF:3,22}=2,75$; $p<0,1$). A 15 nm ZnO-nál a 160,69 mg/l Zn koncentrációban a kontrollhoz képest szignifikáns negatív, majd a legmagasabb koncentrációban viszont marginális biostimuláló hatást tapasztaltam (3. ábra). Az 5. táblázatban láthatjuk, hogy a legalacsonyabb koncentrációban fennálló negatív hatás csak a totális biomasszában volt kimutatható, a talaj gombatartalmánál nem, ebből arra következtethetünk, hogy a talajban élő baktériumközösségek érzékenyebbek bizonyultak a gombáknál. A 140 nm ZnO-nál viszont a 160,69 mg/l Zn koncentrációban volt marginális biostimuláció a kontroll csoporthoz képest (4. ábra). A 15 nm-es anyag szignifikánsan erősebb hatást fejtett ki a Wakasugi talajmintára, mint a Hiruzenre (Kétutas ANOVA, Talaj: $F_{DF:1,22}=14,86$; $p<0,001$). A Hiruzen-i mintáknál a legmagasabb koncentrációban, hasonlóan a Wakasugi talajhoz, a 15 nm ZnO részecskének volt marginálisan szignifikáns biostimuláló hatása, a 140 nm ZnO nem fejtett ki szignifikáns hatást a talaj biomasszájára. Ezen felül egyik talajmintánál sem befolyásolták az anyagok a gomba/baktérium arányt (5-6. táblázat). Az adatsor normalitás ellenőrzése során normális eloszlást mutatott ($W = 0,97$; $p > 0,05$).



3. ábra. 15 nm ZnO hatása a mikrobiális biomasszára két különböző talajmintában. Koncentrációnként 3, kontroll csoportnál 6 ismétlésben (Hiruzen talaj – Δ –, Wakasugi talaj – \blacksquare –). Szignifikancia szintek jelölései: \bullet $p<0,1$; * $p<0,05$. Egy utas ANOVA, Tukey teszt: talaj típusonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



4. ábra. 140 nm ZnO hatása a mikrobiális biomasszára két különböző talajmintában. Koncentrációnként 3, kontroll csoportnál 6 ismétlésben (Hiruzen talaj – Δ –, Wakasugi talaj – \blacksquare –). Szignifikancia szintek jelölései: \bullet $p < 0,1$. Egy utas ANOVA, Tukey teszt: talaj típusonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

5. táblázat. A GC-vel mért átlagos PLFA értékek a Hiruzen és a Wakasugi talajminta esetében 15 nm ZnO jelenlétében. Koncentrációként 3, kontroll csoportnál 6 ismétlésben történt a mérés.

15 nm ZnO								
	Hiruzen PLFA értékek (200 µl mintában, nmol/g)				Wakasugi PLFA értékek (200 µl mintában, nmol/g)			
	Kontroll (-)	160,69 mg/kg Zn	321,37 mg/kg Zn	624,75 mg/kg Zn	Kontroll (-)	160,69 mg/kg Zn	321,37 mg/kg Zn	624,75 mg/kg Zn
i15:0	42,863 ± 9,760	51,314 ± 3,033	49,258 ± 3,222	46,803 ± 9,778	43,916 ± 5,256	36,470 ± 2,263	42,192 ± 3,919	48,875 ± 2,710
α15:0	14,127 ± 2,942	16,777 ± 0,806	15,629 ± 1,085	15,148 ± 2,845	12,497 ± 1,625	10,827 ± 0,395	12,006 ± 1,008	13,603 ± 1,057
15:0	3,380 ± 0,602	3,760 ± 0,327	3,902 ± 0,192	3,584 ± 0,691	3,459 ± 0,467	2,774 ± 0,405	3,085 ± 0,333	3,482 ± 0,297
i16:0	19,412 ± 2,490	21,325 ± 0,988	20,742 ± 1,706	20,593 ± 2,845	27,630 ± 4,023	23,231 ± 2,425	26,796 ± 2,568	28,487 ± 1,874
i17:0	13,120 ± 1,108	13,854 ± 0,431	13,342 ± 0,931	13,793 ± 1,635	12,517 ± 1,221	11,117 ± 0,757	12,692 ± 1,101	13,483 ± 0,887
cys17:0	11,264 ± 1,051	11,995 ± 0,332	11,454 ± 0,877	12,051 ± 1,307	7,241 ± 0,699	6,372 ± 0,482	7,209 ± 0,614	7,828 ± 0,516
17:0	3,222 ± 0,320	3,549 ± 0,153	3,311 ± 0,286	3,483 ± 0,304	2,738 ± 0,282	2,488 ± 0,217	2,728 ± 0,224	2,890 ± 0,187
Gomba: cys18:2ω6	17,682 ± 1,660	19,295 ± 1,598	17,834 ± 1,688	18,903 ± 1,207	9,654 ± 0,772	9,099 ± 1,071	9,239 ± 0,823	10,412 ± 0,925
cys18:1ω7	35,573 ± 2,933	37,327 ± 1,133	36,280 ± 2,538	37,996 ± 3,253	24,167 ± 11,632	18,890 ± 11,916	20,753 ± 13,797	31,206 ± 2,050
cys19:0	1,445 ± 0,291	1,235 ± 0,304	1,288 ± 0,046	1,543 ± 0,178	1,206 ± 0,221	0,483 ± 0,103	0,755 ± 0,450	1,244 ± 0,106
Teljes biomassza	162,088 ± 22,248	180,431 ± 7,784	173,040 ± 12,417	173,897 ± 23,818	145,026 ± 15,038	121,752 ± 4,617	137,455 ± 9,951	161,510 ± 9,757
Gomba/baktérium arány	0,123 ± 0,010	0,120 ± 0,005	0,115 ± 0,003	0,123 ± 0,011	0,072 ± 0,006	0,081 ± 0,014	0,072 ± 0,009	0,069 ± 0,003

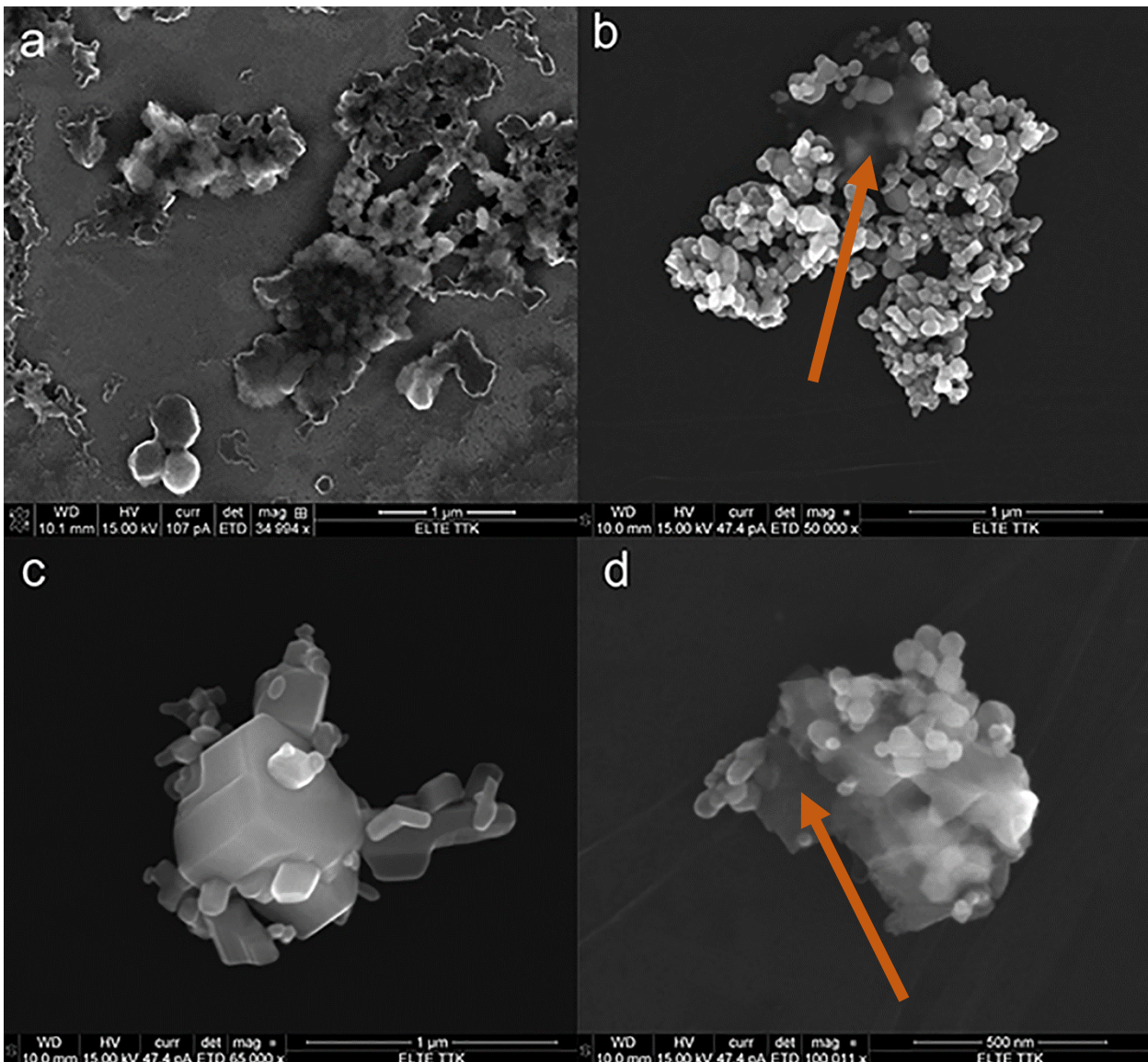
6. táblázat. A GC-vel mért átlagos PLFA értékek a Hiruzen és a Wakasugi talajminta esetében 140 nm ZnO jelenlétében. Koncentrációként 3, kontroll csoportnál 6 ismétlésben történt a mérés.

140 nm ZnO								
	Hiruzen PLFA értékek (200 µl mintában, nmol/g)				Wakasugi PLFA értékek (200 µl mintában, nmol/g)			
	Kontroll (-)	160,69 mg/kg Zn	321,37 mg/kg Zn	624,75 mg/kg Zn	Kontroll (-)	160,69 mg/kg Zn	321,37 mg/kg Zn	624,75 mg/kg Zn
i15:0	42,863 ± 9,760	34,798 ± 2,355	37,899 ± 6,680	41,266 ± 11,236	43,916 ± 5,256	46,107 ± 2,987	43,784 ± 5,181	48,685 ± 2,169
α15:0	14,127 ± 2,942	11,288 ± 0,964	12,775 ± 2,345	13,316 ± 3,572	12,497 ± 1,625	13,078 ± 0,942	12,547 ± 1,612	14,030 ± 0,705
15:0	3,380 ± 0,602	2,735 ± 0,135	3,200 ± 0,452	3,375 ± 0,867	3,459 ± 0,467	3,401 ± 0,330	3,119 ± 0,552	3,439 ± 0,174
i16:0	19,412 ± 2,490	17,318 ± 0,586	18,175 ± 2,491	19,255 ± 3,193	27,630 ± 4,023	28,414 ± 2,222	26,483 ± 3,050	28,344 ± 1,281
i17:0	13,120 ± 1,108	12,265 ± 0,679	12,856 ± 1,223	12,905 ± 1,736	12,517 ± 1,221	12,953 ± 0,961	12,883 ± 0,865	13,998 ± 0,528
cys17:0	11,264 ± 1,051	10,662 ± 0,623	11,098 ± 1,291	11,004 ± 1,625	7,241 ± 0,699	7,427 ± 0,679	7,373 ± 0,420	8,072 ± 0,396
17:0	3,222 ± 0,320	3,066 ± 0,103	3,204 ± 0,365	3,213 ± 0,473	2,738 ± 0,282	2,844 ± 0,221	2,860 ± 0,188	3,093 ± 0,112
Gomba: cys18:2ω6	17,682 ± 1,660	16,548 ± 0,253	16,871 ± 1,518	17,650 ± 1,961	9,654 ± 0,772	10,481 ± 0,701	10,119 ± 0,616	11,138 ± 0,695
cys18:1ω7	35,573 ± 2,933	33,789 ± 1,565	34,830 ± 3,637	35,392 ± 5,264	24,167 ± 11,632	30,220 ± 1,969	30,289 ± 1,615	33,166 ± 1,188
cys19:0	1,445 ± 0,291	1,732 ± 0,170	1,742 ± 0,233	1,584 ± 0,306	1,206 ± 0,221	1,239 ± 0,085	0,720 ± 0,192	0,606 ± 0,044
Teljes biomassza	162,088 ± 22,248	144,199 ± 7,297	152,651 ± 19,707	158,960 ± 28,753	145,026 ± 15,038	156,164 ± 10,742	150,177 ± 13,957	164,572 ± 6,964
Gomba/baktérium arány	0,123 ± 0,010	0,130 ± 0,006	0,125 ± 0,005	0,127 ± 0,015	0,072 ± 0,006	0,072 ± 0,001	0,072 ± 0,004	0,073 ± 0,003

3.2. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

3.2.1. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

A második SEM vizsgálat során talajoldat jelenlétében készítettem fényképeket a vizsgálati anyagokról (5. ábra). A képek alapján jól látható, hogy a nZnO részecskék hozzákötődtek a talajoldatban található szerves összetevőkhöz (5. ábra b, c, d) és a talajrészecskékkel nagyobb aggregátumokat képeztek, amelyek már nehezebben felvehetőek a talajban élő organizmusok számára.



5. ábra. SEM képek a talajoldatról önmagában (a), talajoldat és 15 nm-es ZnO keverékéről (b), talajoldat és 140 nm ZnO keverékéről (c) és egy mintakép, ahol jól látszódik a 15 nm-es ZnO részecskék kötődése egy talajszemcséhez (d).

3.2.2. Cink kioldódás mérés

A komplex Zn kioldódás mértékét Milli-Q vízben és talajoldatban a 7. táblázatban tüntettem fel. A mért adatok nem mutattak normális eloszlást ($W=0,83$ $p<0,05$). Mindkét anyag esetében szignifikánsan jóval alacsonyabb az oldott cink mennyisége a talajoldatban, mint a Milli-Q vizes közegben (GLS_{DF:4,8}: 15 nm: $t=8,04$, $p<0,001$; 140 nm: $t=-9,27$, $p<0,001$). 24 óra elteltével mindkét anyagnál majdnem a fele, 48 óra elteltével a 15 nm ZnO esetében egy negyede, a 140 nm ZnO esetében két harmada lett talajoldatban az oldott cink mennyisége. A Milli-Q vizes közegben 24 órás expozíció után nem volt különbség a két anyag oldódásában, de 48 óra elmúltával a 15 nm ZnO oldódása a 140 nm-es anyag másfélszeresére növekedett (GLS_{DF:2,4}: $t=33,60$, $p<0,001$). A talajoldatnál már 24 órát követően is szignifikánsan nagyobb mennyiségű oldódás történt a 15 nm ZnO esetében (35%-os növekedés), mint a nagyobb szemcseméretű ZnO-ból (GLS_{DF:2,4}: $t=26,29$, $p<0,001$). Ezzel szemben 48 órát követően megfordult a trend és a nagyobb szemcseméret esetén tapasztaltam magasabb oldott cink mennyiséget (GLS_{DF:2,4}: $t=-4,36$, $p<0,001$). A 15 nm ZnO másfélszerese oldódott ki a nagyszemcsés anyagból. Talajoldatban a 48 órás mintánál a 140 nm ZnO oldódási intenzitása hasonló mértékben növekedett a Milli-Q víznél tapasztaltakkal a 24 órás mintához viszonyítva (GLS_{DF:2,4}: Milli-Q: $t=5,49$, $p<0,01$; Talajoldat: $t=5,97$, $p<0,01$). 15 nm ZnO mintánál duplájára növekedett az oldott cink mennyisége Milli-Q víz közegben (GLS_{DF:2,4}: $t=20,38$, $p<0,001$), ezzel szemben talajoldatban szignifikáns csökkenés történt a 24 órás és a 48 órás mintavétel között (GLS_{DF:2,4}: $t=-8,16$, $p<0,01$).

A pH érték az összes teszt anyagnál (15 nm, 140 nm ZnO és ZnCl₂) 6-6,5 volt Milli-Q vizes közegben és 7-7,5 volt a talajoldat esetében.

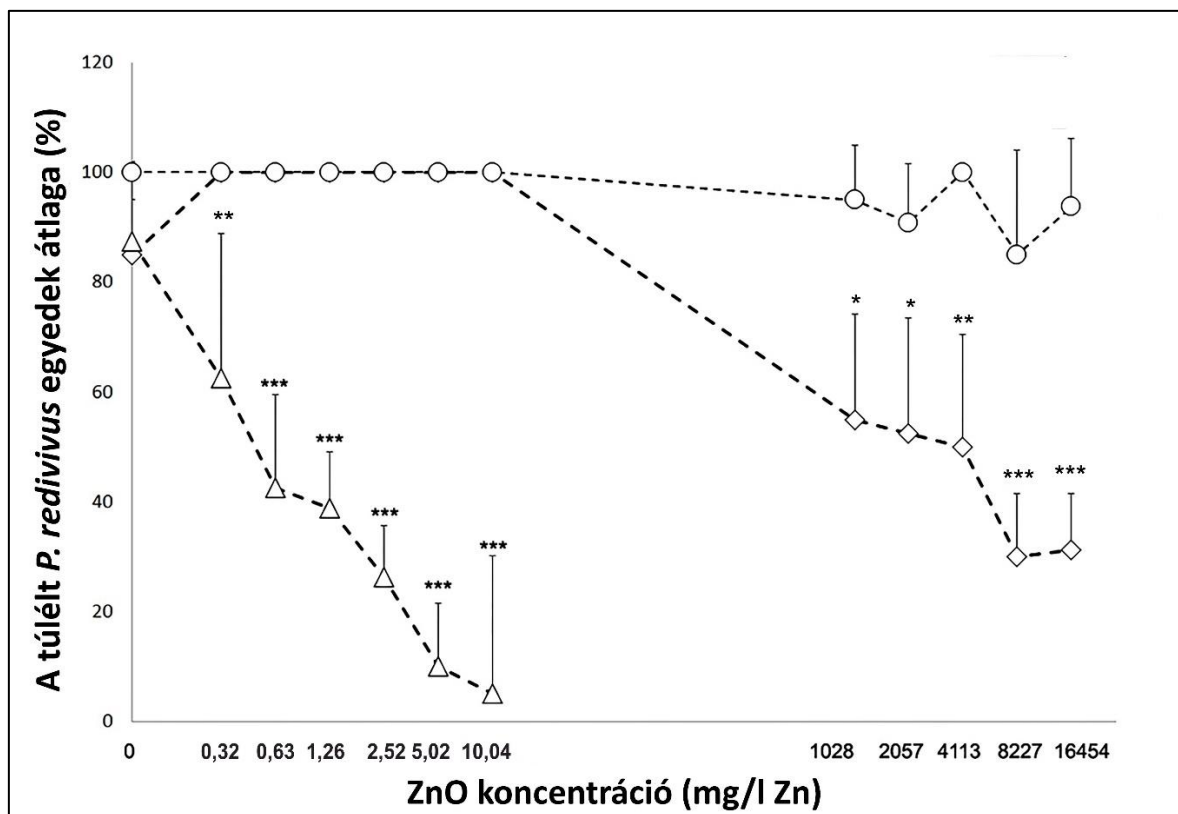
7. táblázat. A 15 nm ZnO és a 140 nm ZnO részecskékből mért Zn oldódása Milli Q vízben és talajoldatban (Zn mg/l).

	Milli-Q víz		Talajoldat	
	24 óra	48 óra	24 óra	48 óra
15 nm ZnO	2,73±0,24	5,67±0,08	1,85±0,03	1,65±0,03
140 nm ZnO	2,57±0,22	3,34±0,09	1,37±0,01	2,57±0,05

3.2.3. *Panagrellus redivivus* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek

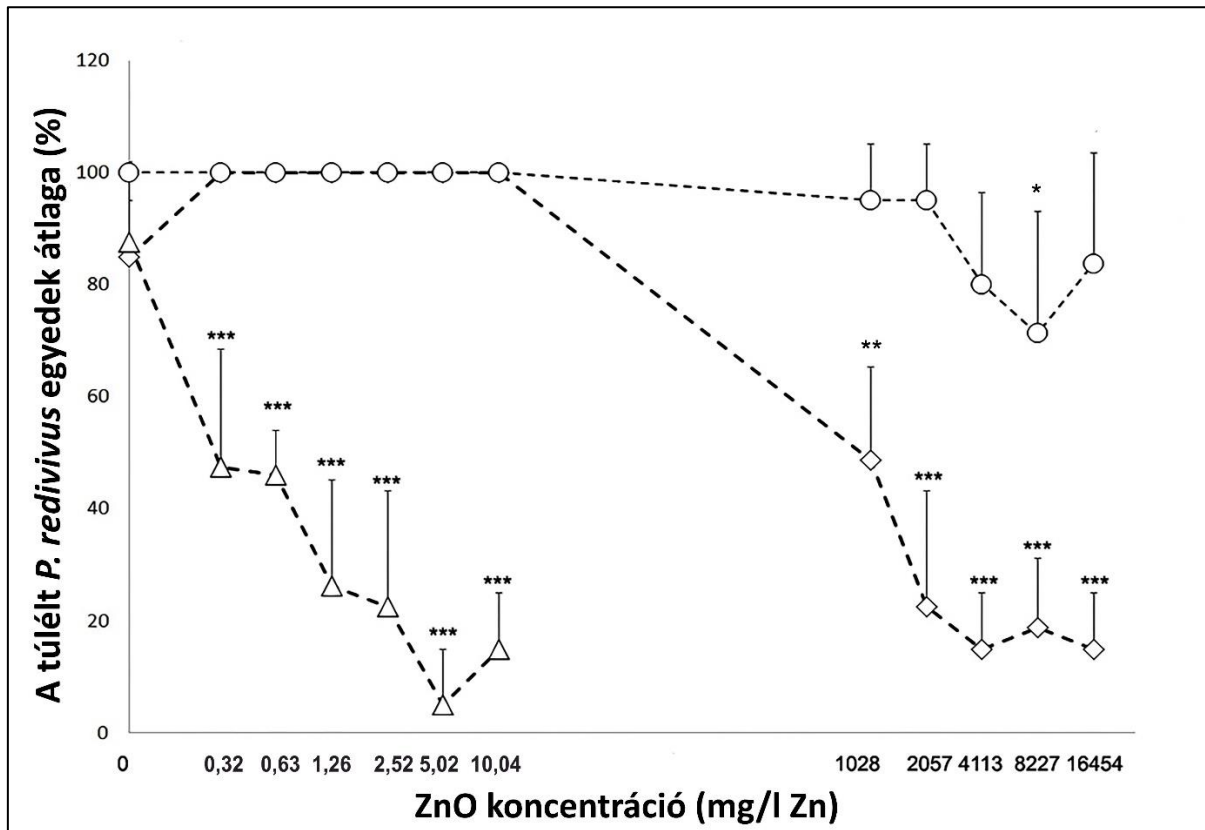
Az akut mortalitási vizsgálat során Milli-Q vizes közegben minden tesztanyag nagyságrendekkel toxikusabb volt, mint talajoldatban (GLS_{DF:4,52}: 15 nm: $t=5,63$, $p<0,001$; 140

nm: $t=5,64$, $p<0,001$; $ZnCl_2$: $t=5,03$, $p<0,001$) (6-8. ábra). A mért adatok nem mutattak normális eloszlást ($W=0,83$; $p<0,05$). A LOAEC értékek 15 nm ZnO és 140 nm ZnO: 0,32 mg/l Zn és $ZnCl_2$ 1,26 mg/l Zn voltak. Talajoldatban nem volt semmilyen hatása a 15 nm és a 140 nm ZnO-nak a Milli-Q víz közegnél használt koncentráció sorozatban (6-7. ábra), csak a magasabb koncentrációkban és kizárólag a 48 órás expozíciós idő után (LOAEC: 15 nm ZnO és 140 nm ZnO: 1028,27 mg/l). A talajoldatban a $ZnCl_2$ toxikusabbnak bizonyult a másik két tesztanyagnál ($GLS_{DF:4,48}$: 15 nm: $t=-3,27$, $p<0,01$; 140 nm: $t=3,18$, $p<0,01$) (8. ábra), a magasabb koncentrációsorban már 24 óra után az összes egyed elpusztult (LOAEC: 10,04 mg/l Zn). A talajoldatban emellett a két szemcseméret hatásai között is találtam szignifikáns különbséget ($GLS_{DF:4,44}$: $t=-2,47$, $p<0,05$), ezt az LC_{50} értékek is alátámasztják (8. táblázat). Itt a 140 nm-es nZnO bizonyult toxikusabbnak. Milli-Q vizes közegben nem tapasztaltam toxicitási különbséget az anyagok között.



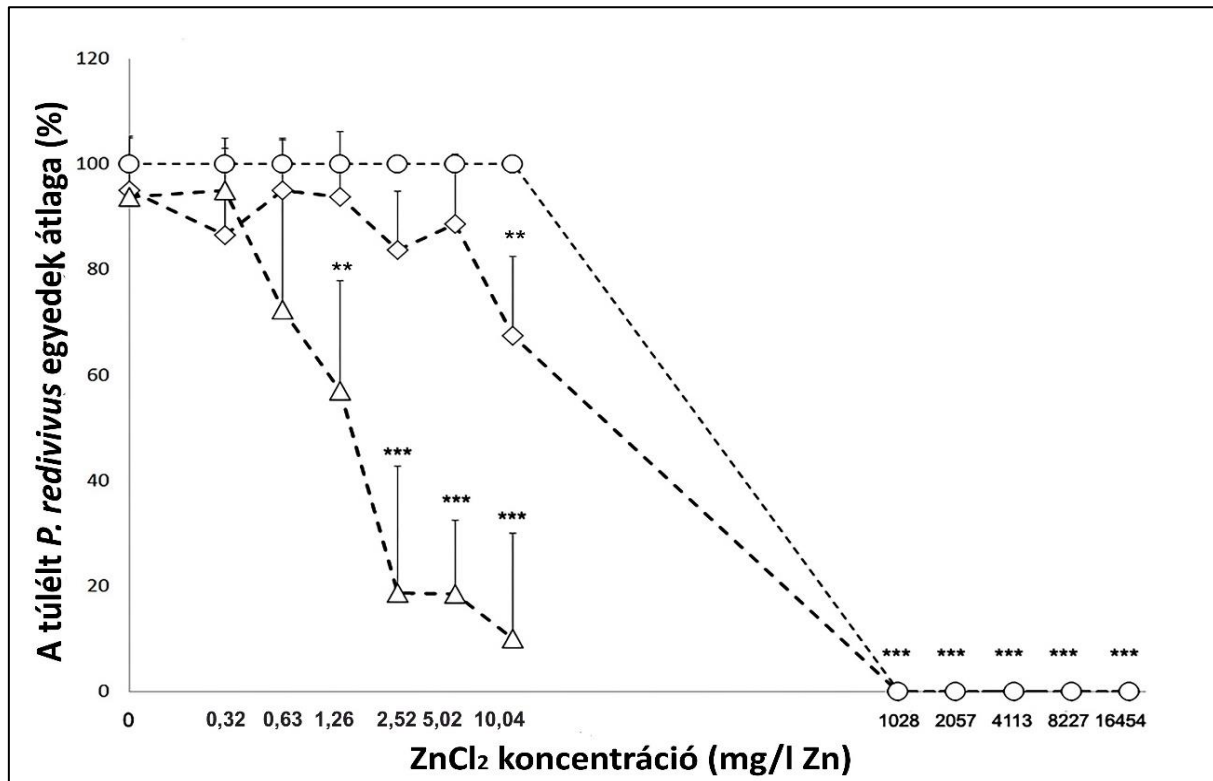
6. ábra. A tesztközeg hatása *P. redivivus* túlélésére 15 nm ZnO jelenlétében (Milli Q vízben 24 órás expozíciós idő – Δ – és talajoldatban 24 órás – \circ – és 48 órás – \diamond – expozíciós idő elteltével.)

Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



7. ábra. A tesztközeg hatása *P. redivivus* túlélésére 140 nm ZnO jelenlétében (Milli Q vízben 24 órás expozíciós idő – Δ – és talajoldatban 24 órás – ○ – és 48 órás – ◇ – expozíciós idő elteltével).

Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



8. ábra. A tesztközeg hatása *P. redivivus* túlélésére ZnCl₂ jelenlétében (Milli Q vízben 24 órás expozíciós idő – Δ – és talajoldatban 24 órás – ○ – és 48 órás – ◇ – expozíciós idő elteltével). Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: ** p< 0,01; *** p<0,001. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

8. táblázat. LC₅₀ értékek 15 nm és 140 nm ZnO, illetve ZnCl₂ hatására *Panagrellus redivivus*-ra Milli-Q vízben (24 óra) és talajoldatban (48 óra). Koncentrációnként 4 ismétlés vizsgálata során.

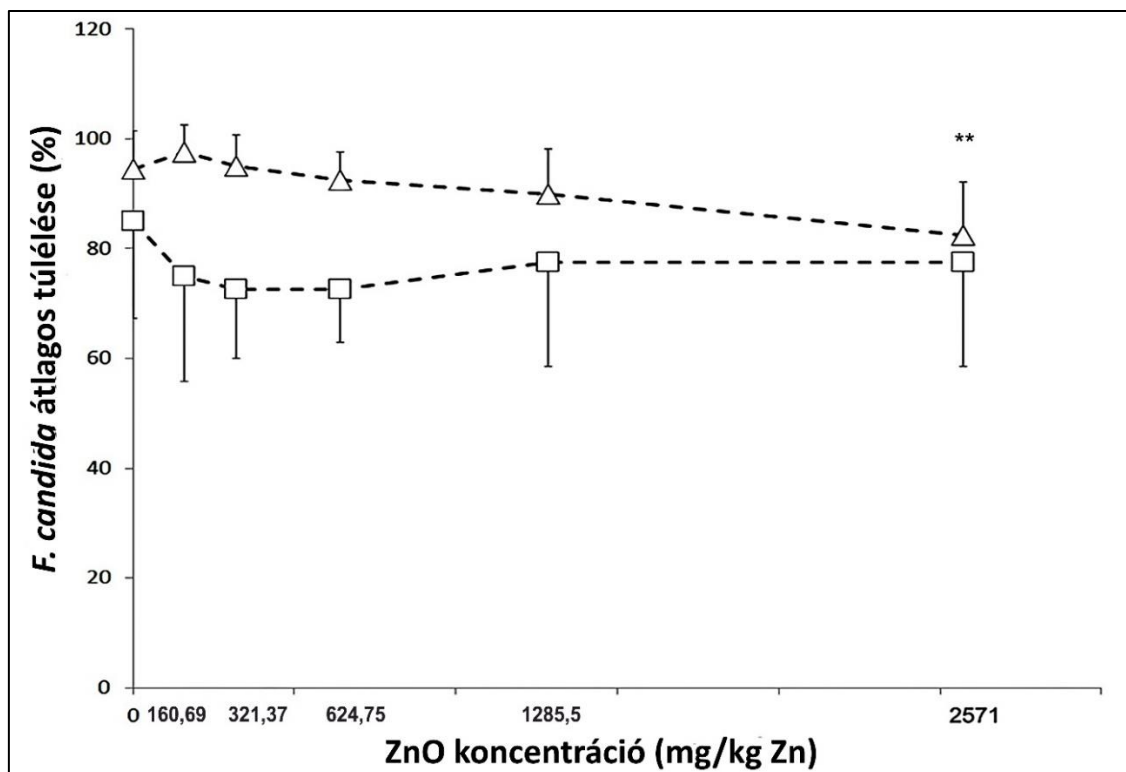
<i>Panagrellus redivivus</i> (LC ₅₀ ; mg/l Zn)					
Milli-Q víz (24 óra)			Talajoldat (48 óra)		
15 nm	140 nm	ZnCl ₂	15 nm	140 nm	ZnCl ₂
0,65	0,40	1,5	3645,30	785,10	15,9
(CI 99%: 0,03–3,57)	(CI 99%: 0,03–1,64)	(CI 99%: 0,70–3,15)	(CI 99%: 170–46893)	(CI 99%: n.m.)	(CI 99%: n.m.)

Megjegyzés: n.m.: matematikai ok vagy nem megfelelő adat miatt nem meghatározott

3.2.4. *Folsomia candida* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek és expozíciós útvonalak

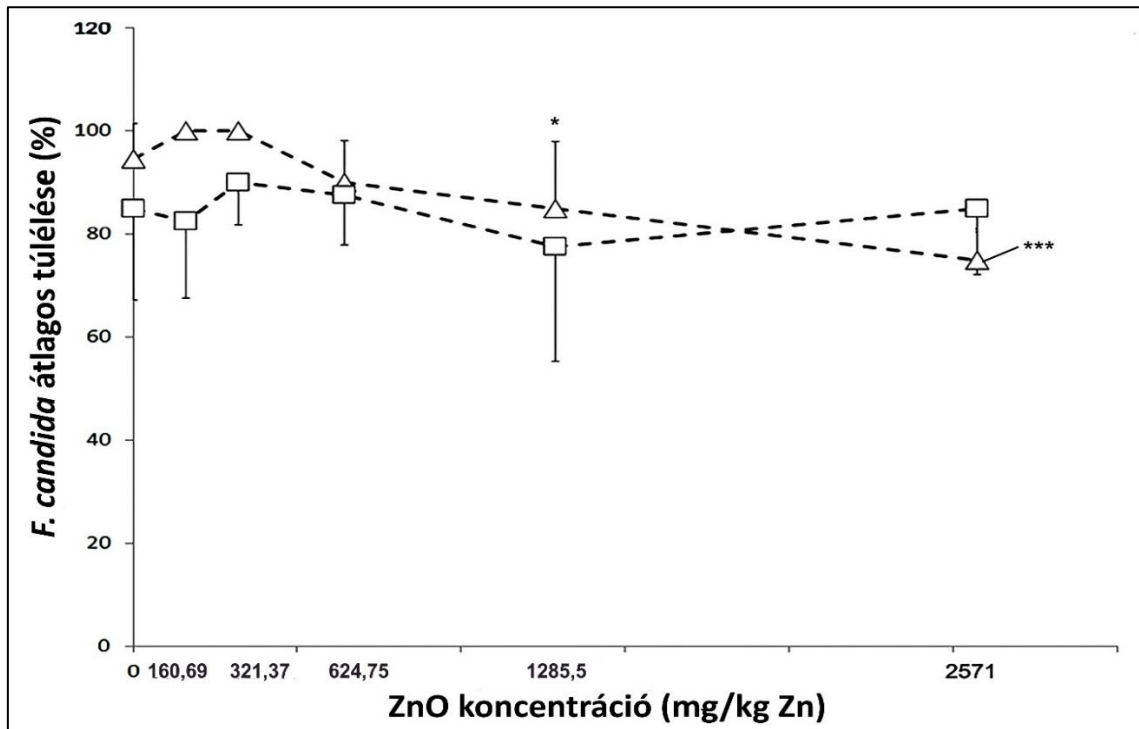
3.2.4.1. Mortalitás vizsgálatok

Az ugróvillás toxicitási tesztben a választott expozíciós útvonalak és tesztközegek (gipszen táplálékba és mesterséges talajközegbe kevert ZnO) szignifikánsan befolyásolták az állatok elhullását (9-11. ábra). A mért adatok nem mutattak normális eloszlást ($W=0,79$; $p<0,05$). A 15 nm ZnO és a ZnCl₂ használatakor mesterséges talajon szignifikánsan nagyobb volt a mortalitás, mint a táplálékba helyezett oldatok esetében (GLS_{DF:4,57}: 15 nm: $t=-5,05$, $p<0,001$; ZnCl₂: $t=-4,83$, $p<0,001$). A mortalitási tesztnél egyik közegben sem tapasztaltam különbséget a szemcseméreték toxicitása között. Viszont a ZnCl₂ a mesterséges talajban szignifikánsan magasabb mortalitást produkált a 15 nm (GLS_{DF:4,55}: $t=9,87$, $p<0,001$) és a 140 nm (GLS_{DF:4,56}: $t=11,06$, $p<0,001$) ZnO-nál. A legmagasabb koncentrációban (2571 mg/kg Zn) a ZnCl₂ kezelés során minden egyed elpusztult. Az LC₅₀ értékeket az 9. táblázatban tüntettem fel.

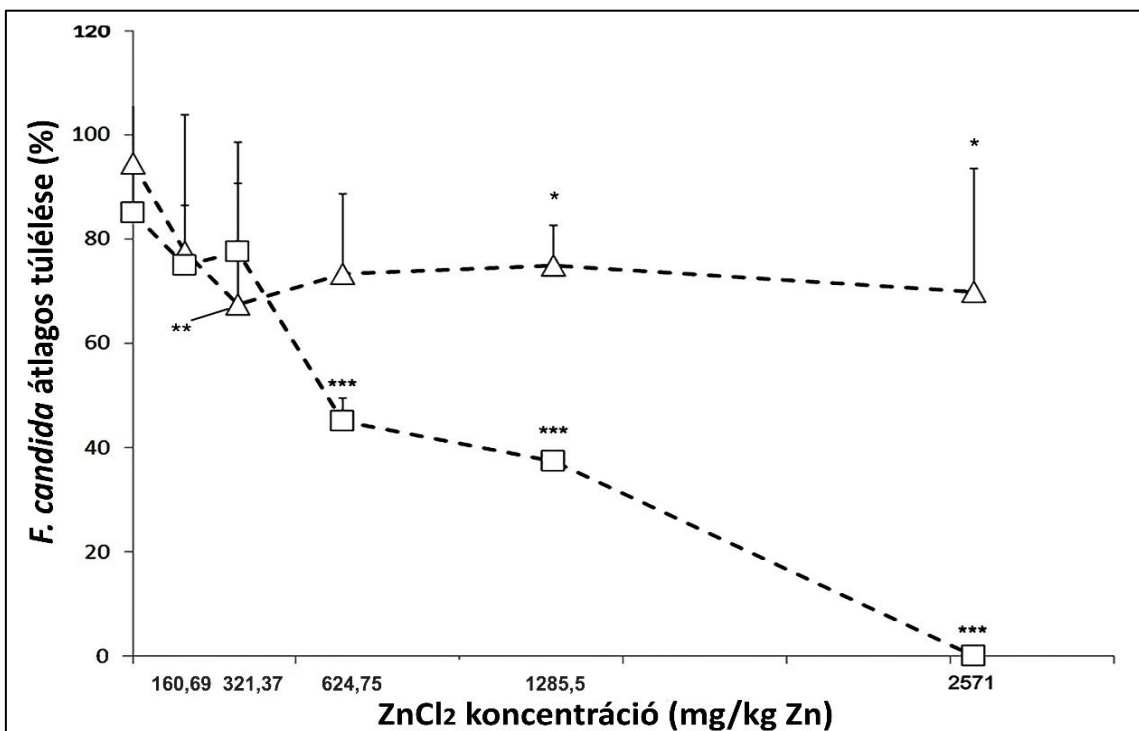


9. ábra. A tesztközeg hatása *F. candida* túlélésére 15 nm ZnO jelenlétében (gipszen – Δ – és mesterséges talajban – □ – 28 nap expozíciós idő elteltével). Szignifikancia szintek jelölései: ** $p<0,01$.

Koncentrációnként 4 db, kontroll vizsgálatnál 8 db ismétlést használtam. Lineáris modellt: anyagonként a kontroll (0 mg/kg) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



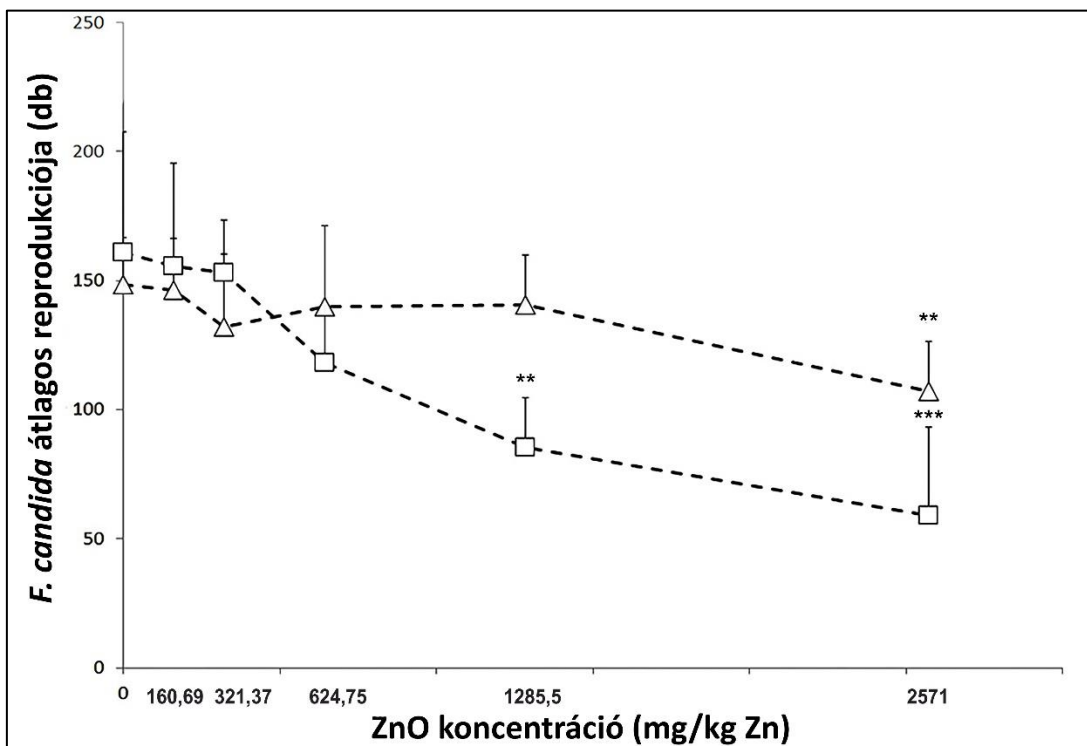
10. ábra. A tesztközeg hatása *F. candida* túlélésére 140 nm ZnO jelenlétében (gipszen- Δ – és mesterséges talajban – \square – 28 nap expozíciós idő elteltével). Koncentrációnként 4 db, kontroll vizsgálatnál 8 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/kg) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



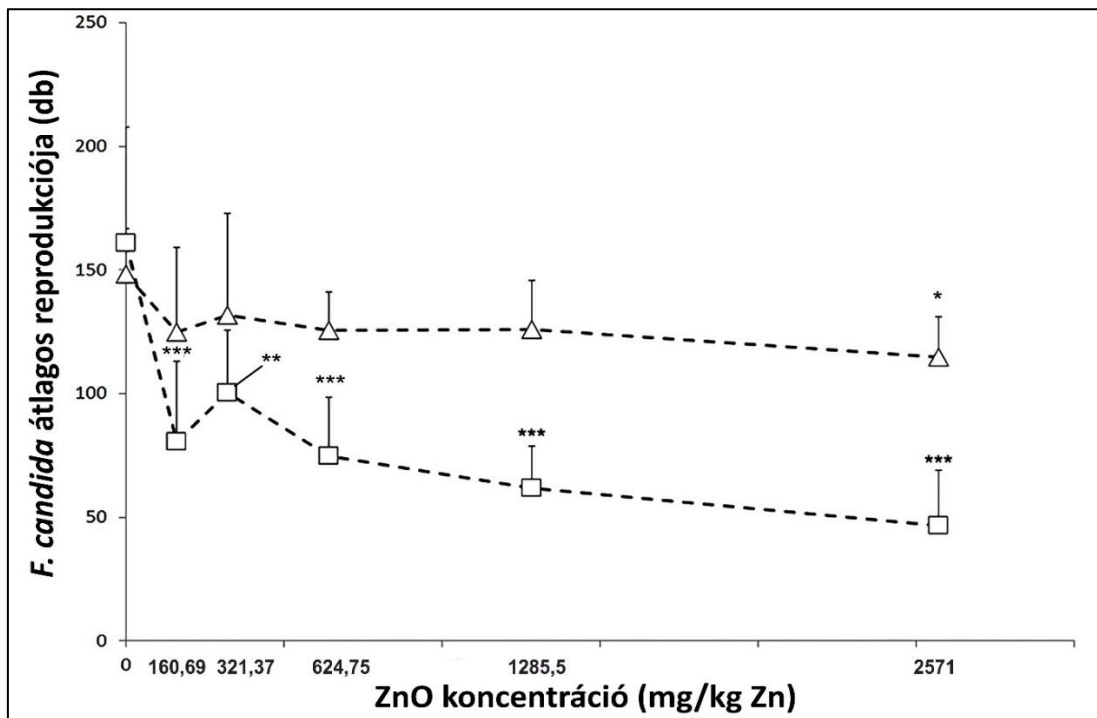
11. ábra. A tesztközeg hatása *F. candida* túlélésére ZnCl₂ jelenlétében (gipszen- Δ – és mesterséges talajban – \square – 28 nap expozíciós idő elteltével). Koncentrációnként 4 db, kontroll vizsgálatnál 8 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/kg) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

3.2.4.2. Reprodukció vizsgálatok

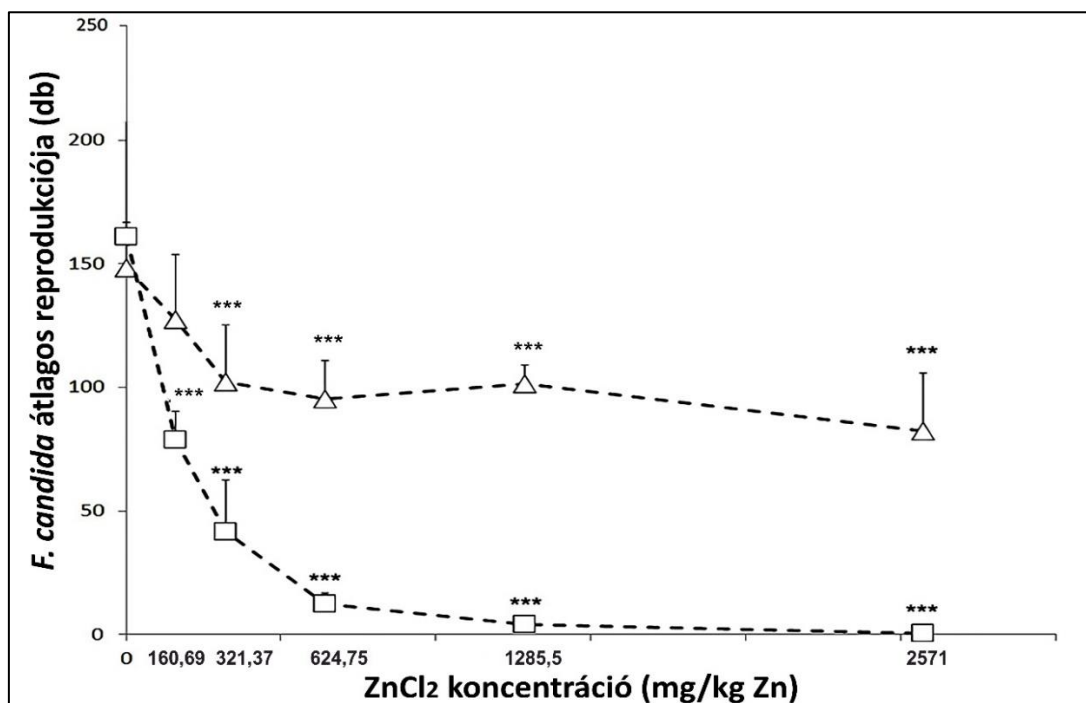
A reprodukció tekintetében is hasonló tendenciát mutatott az expozíciós útvonalak hatása, ebben az esetben már minden anyag esetében erősebb toxicitást tapasztaltam a mesterséges talajban, mint a gipsz közegben táplálékba helyezve (GLS_{DF:4,57}: 15 nm: $t=-3,59$, $p<0,001$; 140 nm: $t=-2,37$, $p<0,05$; ZnCl₂: $t=-2,60$, $p<0,05$) (12-14. ábra). A mért adatok nem mutattak normális eloszlást ($W=0,97$; $p<0,05$). Gipsz közegben a táplálékba helyezve a 15 nm és 140 nm ZnO szemcséknek enyhe és a ZnCl₂ tesztanyagnak erős szaporodás gátló hatása volt (LOAEC: 15 nm és 140 nm ZnO – 2571 mg/kg Zn; ZnCl₂ – 321,28 mg/kg Zn). Továbbá a 140 nm és a ZnCl₂ toxicitása között szignifikáns különbséget is tapasztaltam (GLS_{DF:4,57}: $t=2,28$, $p<0,05$). A mesterséges talajban a reprodukció koncentrációfüggően csökkent. Az ugróvillás teszt során itt először mutatkozott meg szemcseméretfüggő toxikus hatás (GLS_{DF:4,56}: $t=4,20$, $p<0,001$), a 140 nm ZnO-nak volt erősebb gátló hatása a reprodukcióra. A talajba keverve mindkét ZnO részecske enyhébb toxikus hatással bírt, mint a ZnCl₂ (GLS_{DF:4,57}: 15 nm: $t=-1,06$, $p<0,001$; 140 nm: $t=4,64$, $p<0,001$). Ezáltal mesterséges talajközegben reprodukciós teszt során a ZnCl₂ gátolta leginkább a reprodukciós folyamatokat. Ez a hatás az EC₅₀ értékekben is megmutatkozik (9. táblázat).



12. ábra. A tesztközeg hatása *F. candida* reprodukciójára 15 nm ZnO jelenlétében (gipszen – △ – és mesterséges talajban – □ – 28 nap expozíciós idő elteltével). Koncentrációnként 4 db, kontroll vizsgálatnál 8 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Lineáris modell: anyaganként a kontroll (0 mg/kg) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



13. ábra. A tesztközeg hatása *F. candida* reprodukciójára 140 nm ZnO jelenlétében (gipszen– △ – és mesterséges talajban – □ – 28 nap expozíciós idő elteltével). Koncentrációnként 4 db, kontroll vizsgálatnál 8 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/kg) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



14. ábra. A tesztközeg hatása *F. candida* reprodukciójára $ZnCl_2$ jelenlétében (gipszen– △ – és mesterséges talajban – □ – 28 nap expozíciós idő elteltével). Koncentrációnként 4 db, kontroll vizsgálatnál 8 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/kg) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

9. táblázat: A 15 nm és 140 nm ZnO EC₅₀ és LC₅₀ értékei gipsz és mesterséges talaj közegben 28 napos expozíció során.

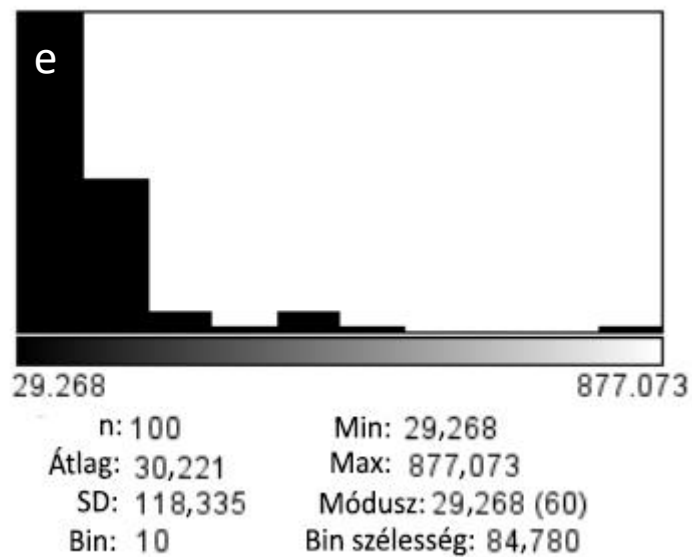
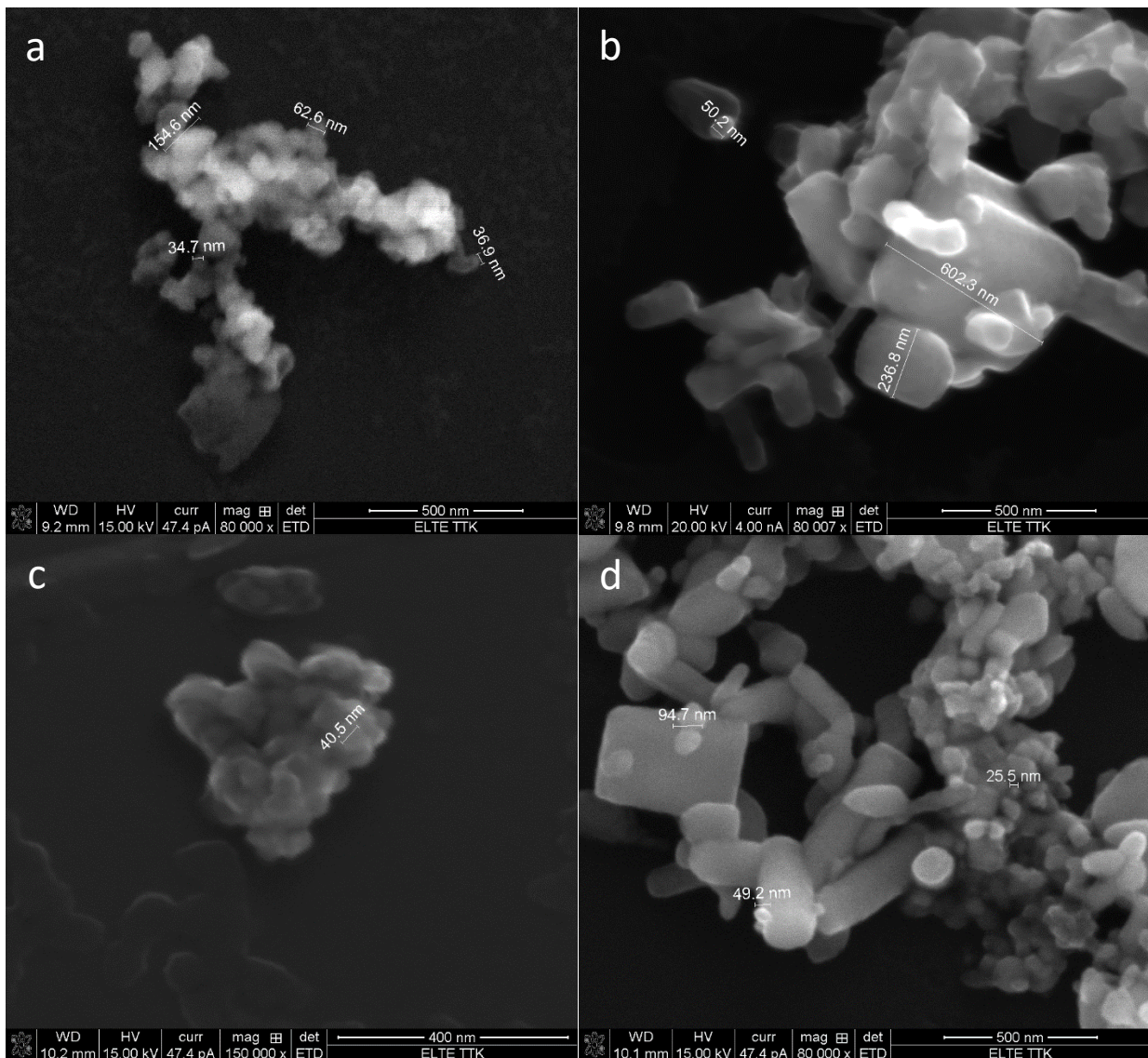
Gipsz					
Reprodukció (EC₅₀)			Mortalitás (LC₅₀)		
15 nm	140 nm	ZnCl ₂	15 nm	140 nm	ZnCl ₂
4594,30	n.m.	4847,13	9324,67	6116,54	n.m.
(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: n.m.)
Mesterséges talaj					
Reprodukció (EC₅₀)			Mortalitás (LC₅₀)		
15 nm	140 nm	ZnCl ₂	15 nm	140 nm	ZnCl ₂
1543,94	393,19	157,93	8228,2	8170	557,31
(CI 95%: 1204,30– 2140,64)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: 144,55– 170,23)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: n.m.)	(CI 95%: 66,09– 2445,21)

Magyarázat: n.m.: matematikai ok vagy nem megfelelő adat miatt nem meghatározott

3.3. Hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata

3.3.1. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

A különböző szemcseméretű anyagok karakterizálása után (3.1.1., 3.2.1. fejezetek) megvizsgáltam a 15 nm és a 140 nm szemcseméretű ZnO 50-50%-os keverékét önállóan (15. ábra c) és mindhárom anyagot (15 nm, 140 nm, keverék) az N-acetilcisztein hozzáadásával is (15. ábra a, b, d). Az Image J szoftver segítségével számolt méreteloszlás a 15. ábra „e” részén látható. Az átlagos méret 100 részecske átmérőjének mérésével 130 ± 118 nm (átlag \pm SD, n = 100) érték lett. Jól látszik, hogy a leggyakoribb részecskeméret a módusz alapján a 30 nm-es, viszont itt már nagyobb aggregátumok is jelen lehetnek (877 nm). Emellett a keveréknél jól megfigyelhető, hogy itt már mind a két alaktípus (gömb, irreguláris) is előfordul a mintákban (15. ábra c, d). A NAC hozzáadása szignifikánsan nem változtatta meg az anyagok méretét vagy morfológiáját. Szemmel láthatóan nem képezett bevonatot az anyagok körül.



15. ábra. SEM képek a kísérleti anyagokról NAC hozzáadásával (15 nm ZnO **(a)**, 140 nm ZnO **(b)**). SEM képek a két kísérleti anyag 50-50%-os keverékéről önmagában **(c)** és NAC hozzáadásával **(d)**. A keverék méreteloszlása **(e)**.

3.3.2. Cink kioldódás mérés

A mitigációs vizsgálatokhoz kapcsolódó komplex Zn^{2+} oldódás mérés során nem volt szignifikáns különbség az önmagában mért két különböző szemcseméretű ZnO között (10. táblázat). Viszont mindkettőből szignifikánsan kevesebb cink ion oldódott ki (~30-40%-kal), mint a két anyag keverékéből (GLS_{DF:2,6}: 15 nm: $t=40,42$, $p<0,001$; 140 nm: $t=22,33$, $p<0,001$). A mért adatok nem mutattak normális eloszlást ($W=0,80$; $p<0,05$). A cink kioldódás növekedése szintén tapasztalható volt a NAC hozzáadása során minden tesztanyagnál (15 és 140 nm ZnO: 20-30%; keverék: 4%). Egyaránt erősen szignifikáns különbség volt a 15 nm (GLS_{DF:2,6}: $t=-58,10$, $p<0,001$) és a 140 nm ZnO (GLS_{DF:2,6}: $t=-16,65$, $p<0,001$), és kevésbé erős, de ugyancsak szignifikáns különbség a keverék esetében (GLS_{DF:2,6}: $t=-4,04$, $p<0,05$) összehasonlítva az anyagok kezeletlen párjainak kioldódási értékeivel. Továbbá minden esetben szignifikáns különbséget találtam a NAC-nel kezelt kísérleti anyagok között (GLS_{DF:2,6}: 15 nm vs. 140 nm: $t=13,96$, $p<0,001$; 15 vs. Mix: $t=2,77$, $p<0,05$; 140 nm vs. Mix: $t=15,28$, $p<0,001$). A 15 nm és a keverék esetében ez a különbség viszonylag enyhe volt (~3%), ezzel szemben a 140 nm ZnO részecskéből mindkét másik anyaghoz képest jóval alacsonyabb mennyiségű oldott cinket mértem.

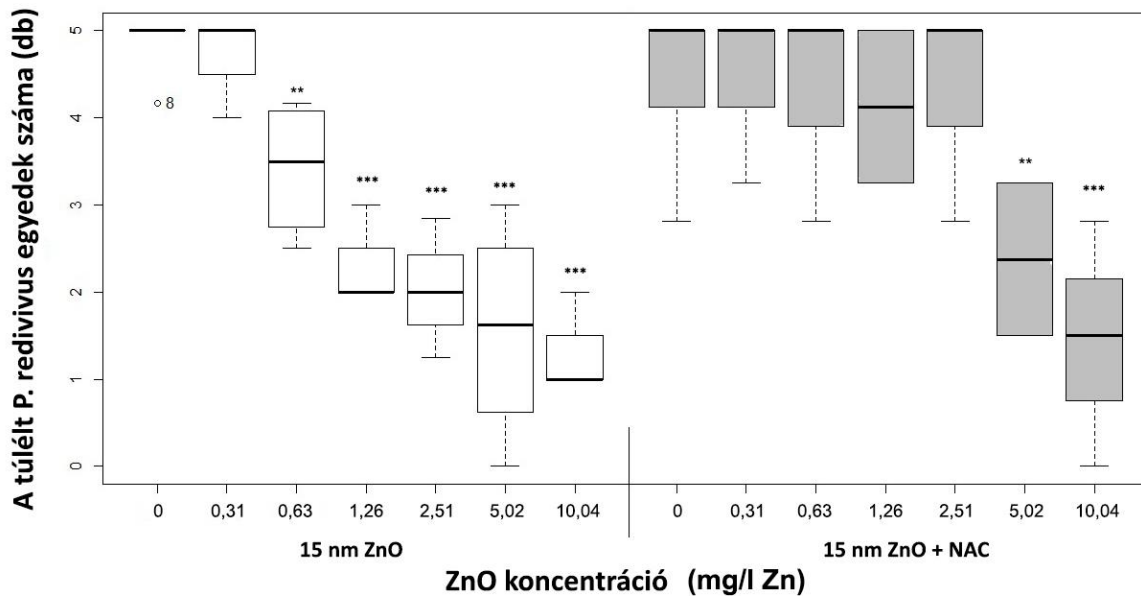
10. táblázat. A 15 nm ZnO, 140 nm ZnO és a keverék oldódása önmagában és NAC hozzáadásával (mg/l).

Cink kioldódás (mg/l – 10,04 mg/l Zn-ből –)			
	15 nm ZnO	140 nm ZnO	Keverék
Tiszta	4,13±0,01	4,31±0,09	5,78±0,07
NAC hozzáadásával	5,87±0,05	5,30±0,05	6,01±0,04

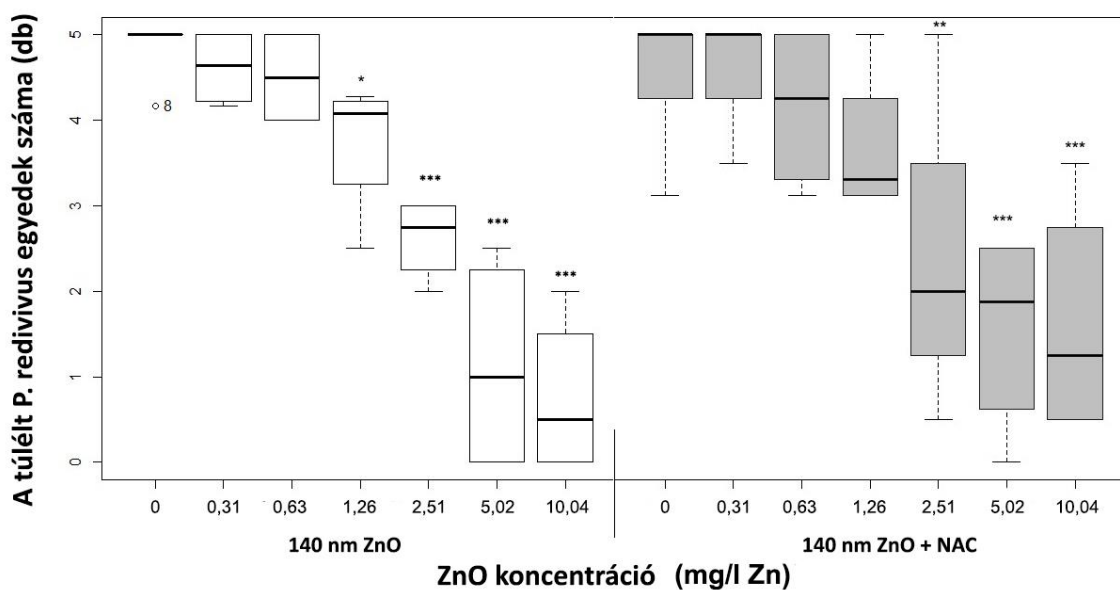
3.3.3. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *Panagrellus redivivus*-ra

Az N-acetilcisztein mitigáló hatását vizsgáló akut mortalitási tesztek során hasonlóan a közegek hatását vizsgáló kísérletekhez, önmagukban nem tapasztaltam szemcseméret függő toxicitást. A mért adatok nem mutattak normális eloszlást ($W=0,85$; $p<0,05$). A kioldódott cink mennyiség alapján beállított koncentráció sorozatban a $ZnCl_2$ szignifikánsan kevésbé toxikusnak bizonyult, mint a két ZnO részecske (GLS_{DF:4,56}: 15 nm: $t=-3,16$, $p<0,05$; 140 nm: $t=-3,16$, $p<0,01$). A NAC hozzáadása erősen szignifikánsan csökkentette a toxikus hatásokat a 15 nm ZnO esetében (GLS_{DF:4,60}: $t=-4,44$, $p<0,001$) (18. ábra). A 140 nm ZnO esetében enyhébb mitigáló hatást tapasztaltam (GLS_{DF:4,56}: $t=-3,34$, $p<0,05$) (19. ábra). A mitigáló hatás a 15 nm ZnO-nál a 2,51 mg/l, míg a 140 nm ZnO-nál már 1,26 mg/l koncentráció felett csökkenő tendenciát mutatott.

Ezekkel szemben a $ZnCl_2$ felhasználásakor statisztikailag igazolható enyhe mitigációt csak a legnagyobb koncentráció (4,23 mg/l Zn) kizárása esetében tapasztaltam ($LM_{DF:3,44}$: $t=2,07$, $p<0,05$). A két különböző szemcseméretre is eltérően hatott a mitigációs kezelés. A két legmagasabb koncentrációt figyelmen kívül hagyva – ahol egyik anyagnál sem volt mitigáló hatás – a 15 nm ZnO jelenlétében erősebb toxicitás csökkenést tapasztaltam, mint a 140 nm ZnO esetében ($GLS_{DF:4,44}$: $t=2,09$, $p<0,05$) (13. táblázat).

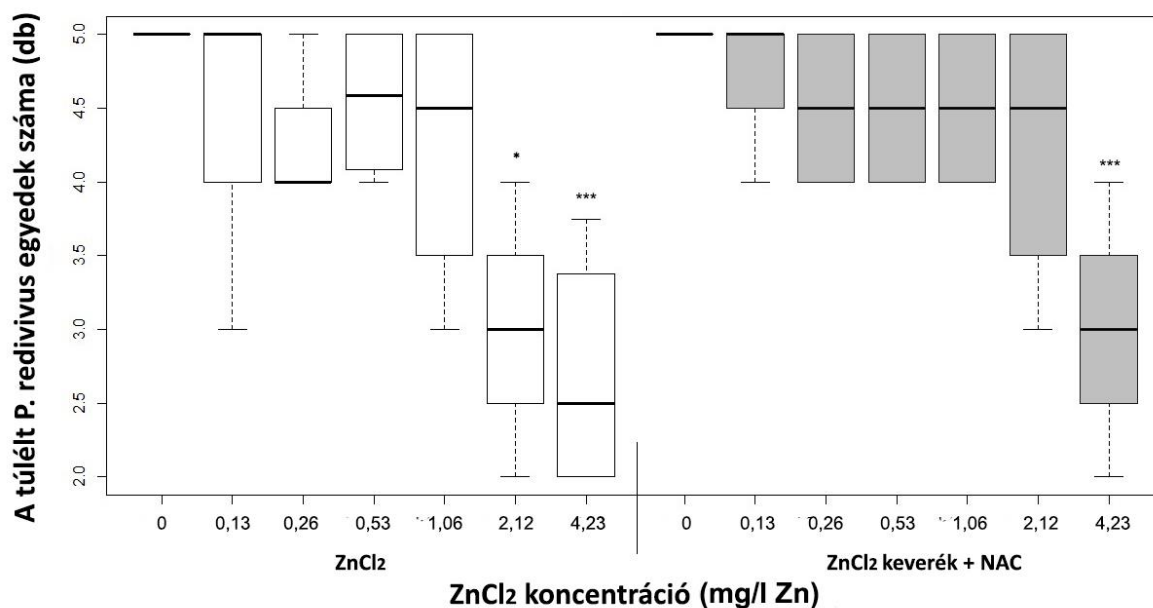


18. ábra. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *P. redivivus*-ra 15 nm ZnO jelenlétében 24 óra expozíciós idő elteltével. Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p<0,05$; *** $p<0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



19. ábra. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *P. redivivus*-ra 140 nm ZnO jelenlétében 24 óra expozíciós idő elteltével. Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

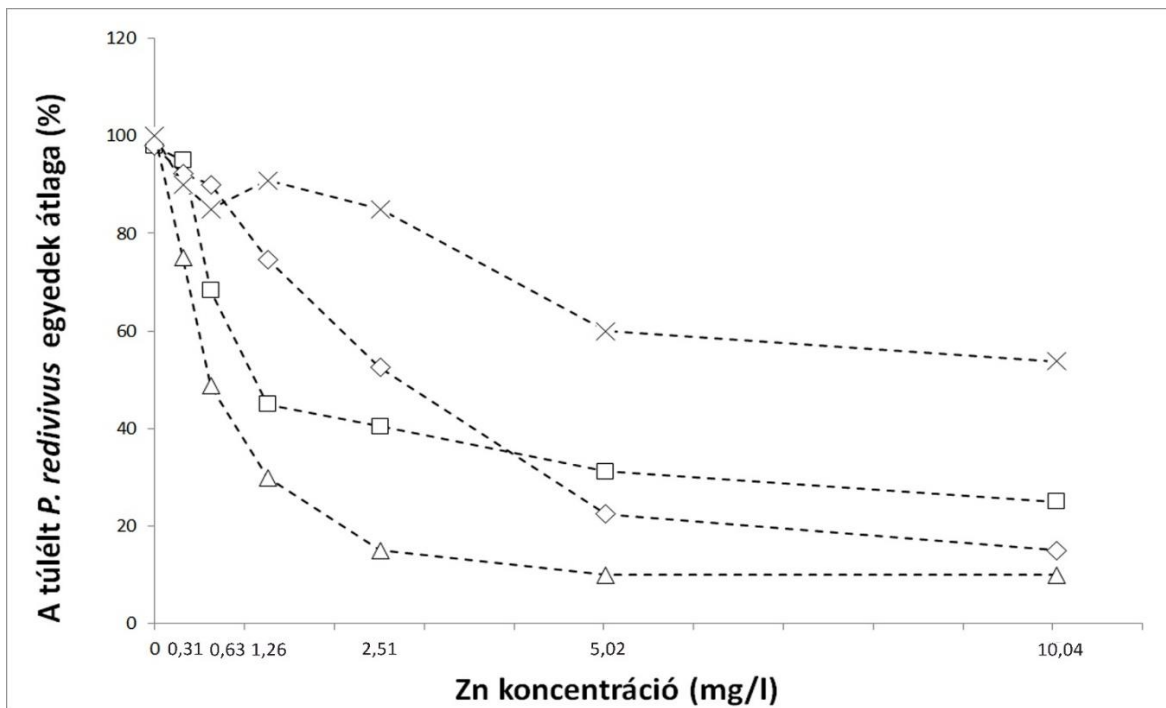


20. ábra. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *P. redivivus*-ra ZnCl₂ jelenlétében 24 óra expozíciós idő elteltével. Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$;

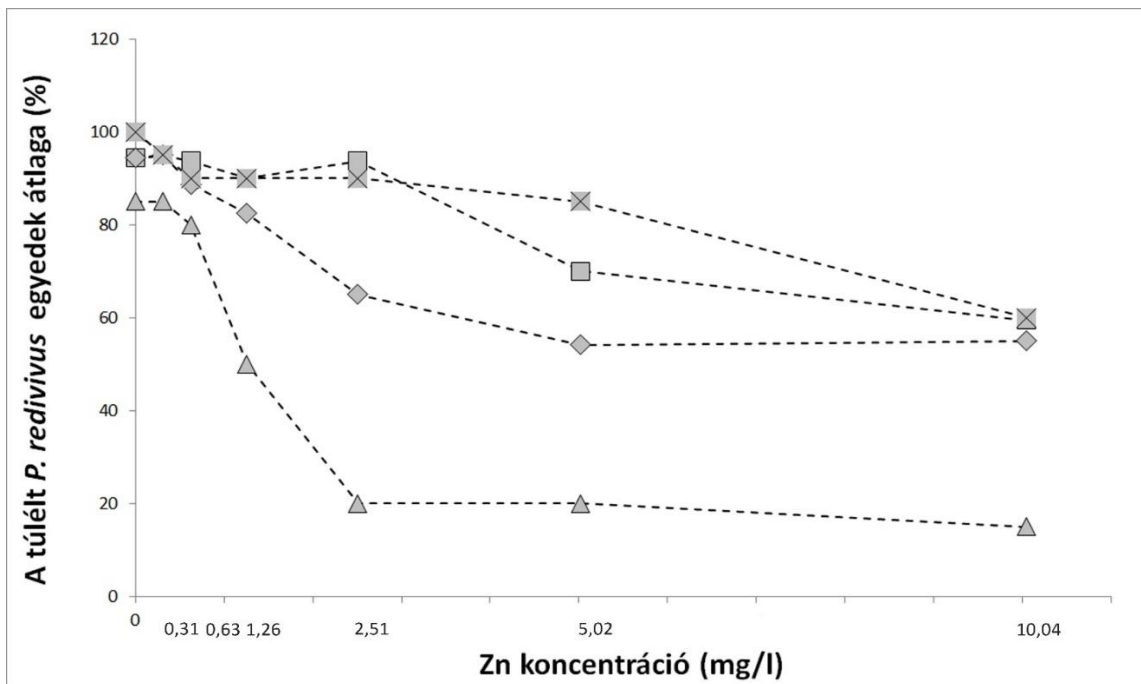
** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

3.3.4. Nano és nagyszemcsés cink-oxid közötti interakció tesztelése

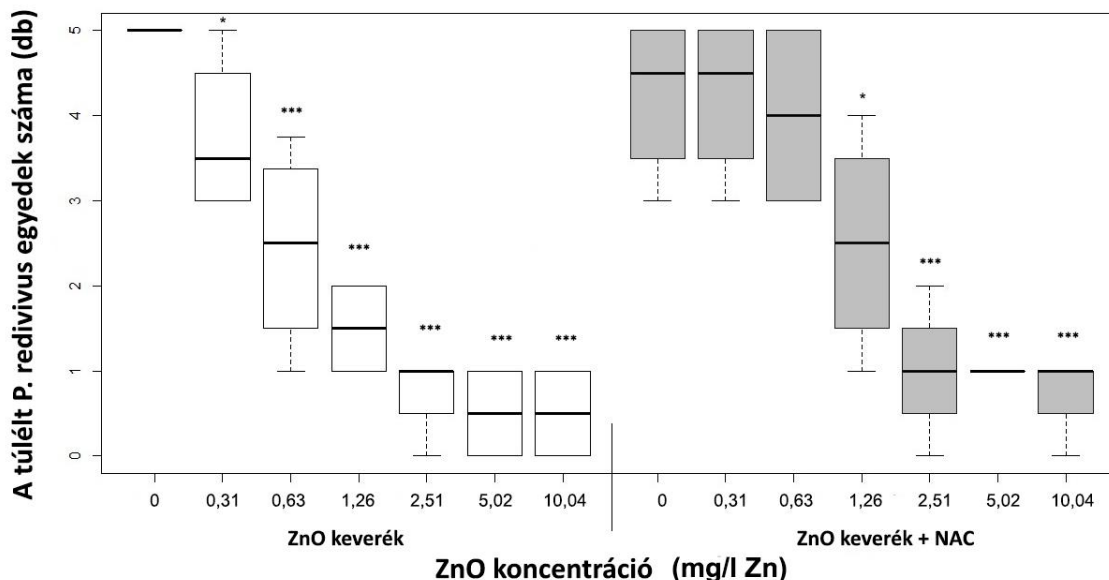
Szinergisztikus toxicitás növekedést tapasztaltam a két szemcseméretű ZnO 50-50%-os keverékének használatakor (21. ábra). A 15 nm ZnO részecskével összehasonlítva szignifikánsan toxikusabbnak bizonyult a keverék (13. táblázat), már önállóan felhasználva is (GLS_{DF:4,56}: 15 nm: $t=2,05$, $p < 0,05$). Továbbá ez a toxicitásbeli különbség még inkább megnövekedett a NAC hozzáadásának következtében, ezáltal már nem csak a 15 nm, de a 140 nm ZnO részecskénél is erősebb lett a toxikus hatása a keveréknek (GLS_{DF:4,56}: 15 nm: $t=-3,33$, $p < 0,01$; 140 nm: $t=-2,50$, $p < 0,01$) (22. ábra). A keverékre nem volt statisztikailag igazolható mitigáló hatással az antioxidáns az összes koncentráció tekintetében, bár az 1,26 mg/l Zn-es koncentrációkig enyhe toxicitás csökkenés volt észlelhető a NAC hozzáadása nélküli keverék hatásához viszonyítva (GLS_{DF:4,28}: $t=-2,33$, $p < 0,05$) (23. ábra). Ez a LOAEC értékekkel is alátámasztható (Tisztán: 0,31 mg/l; NAC hozzáadásával: 1,26 mg/l). A mitigáló hatás gyengébbnek bizonyult a keverék esetében, mint a két ZnO szemcse önálló vizsgálatakor.



21. ábra. Az önmagában adott 15 nm ZnO , 140 nm ZnO, ZnCl₂ és a 15 nm + 140 nm ZnO 50-50%-os keverékének toxikus hatása a *P. redivivus*-ra 24 óra expozíciós idő elteltével (15 nm – □ –, 140 nm – ◇ –, Keverék – △ –, ZnCl₂ – ⊠ –). A ZnCl₂ vizsgálatban a kioldódott ionok alapján állítottam be a koncentráció sort (10,04 mg/l Zn-ből átlagosan 4,23 mg/l Zn), az ábrában így azért szerepel, hogy szemléltethetőek legyenek az eredmények. Az ábrán szereplő adott koncentrációhoz tartozó kioldódás alapján vettem fel az átlagos pontokat. Tehát mindegyik kezelésnél: 0,31 - 0,13; 0,63 - 0,26; 1,26 - 0,53; 2,51 - 1,06; 5,02 - 2,12 és 10,04 - 4,23 mg/l Zn. Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam.



22. ábra. A 15 nm, a 140 nm ZnO, ZnCl₂ önálló és a 15 nm + 140 nm 50-50%-os keverékének toxikus hatása a *P. redivivus*-ra N-acetilcisztein jelenlétében 24 óra expozíciós idő elteltével (15 nm – ■ –, 140 nm – ◆ –, Keverék – ▲ –, ZnCl₂ – ⊠ –). A ZnCl₂ vizsgálatban a kioldódott ionok alapján állítottam be a koncentráció sort (10,04 mg/l Zn-ből átlagosan 4,23 mg/l Zn), az ábrában így azért szerepel, hogy szemléltethetőek legyenek az eredmények. Az ábrán szereplő adott koncentrációhoz tartozó kioldódás alapján vettem fel átlagos pontokat. Tehát mindegyik kezelésnél: 0,31 - 0,13; 0,63 - 0,26; 1,26 - 0,53; 2,51 - 1,06; 5,02 - 2,12 és 10,04 - 4,23 mg/l Zn. Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam.



23. ábra. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *P. redivivus*-ra a 15 nm és 140 nm ZnO 50-50%-os keverékének jelenlétében 24 óra expozíciós idő elteltével. Koncentrációnként 4 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagoként a kontroll és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

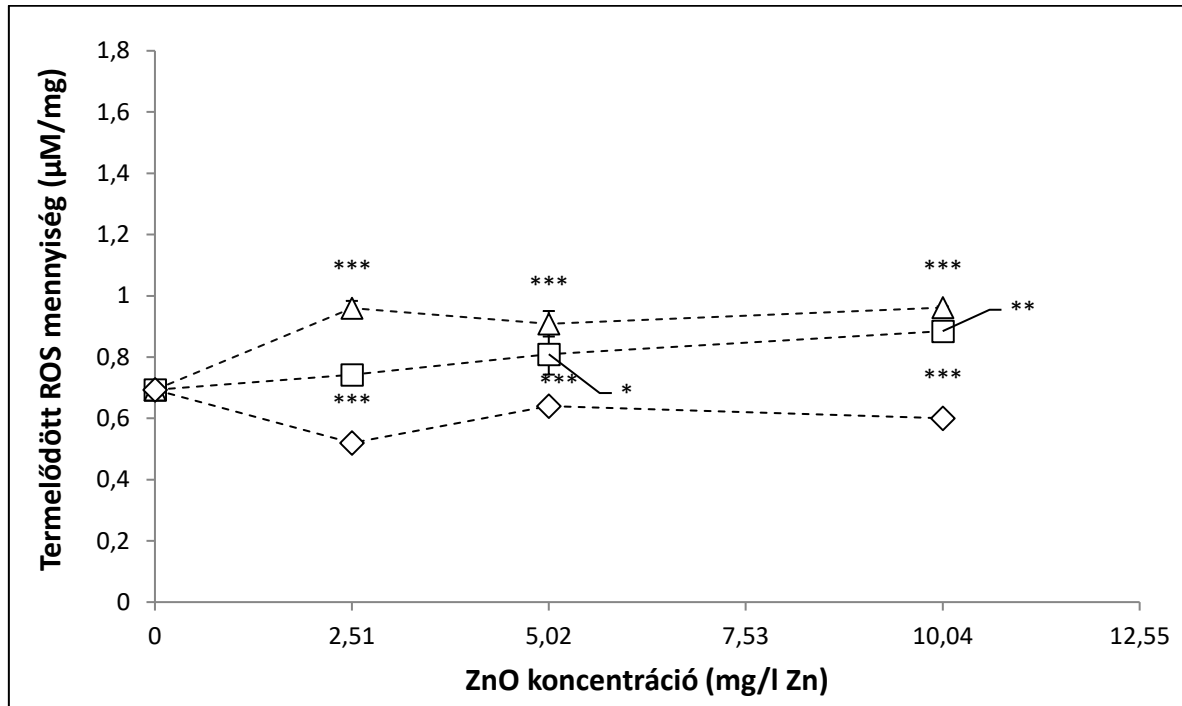
13. táblázat. LC₅₀ értékek 15 nm, 140 nm ZnO, ZnCl₂ és a keverék hatására *Panagrellus redivivus*-ra önállóan és N-acetilcisztein hozzáadásával n.m.: matematikai ok vagy nem megfelelő adat miatt nem meghatározott

	15 nm	140 nm	ZnCl ₂	Keverék
	1,85	2,66	0,78	0,65
Önállóan	(CI95%: 1,1- 3,13)	(CI95%: 1,6- 4,53)	(CI95%: 0,57- 1,07)	(CI 95%: n.m.)
NAC	14,091	10,725	2,107	1,62
hozzáadásával	(CI95%:n.m.)	(CI95%:n.m.)	(CI95%: 1,37- 3,79)	(CI 95%: n.m.)

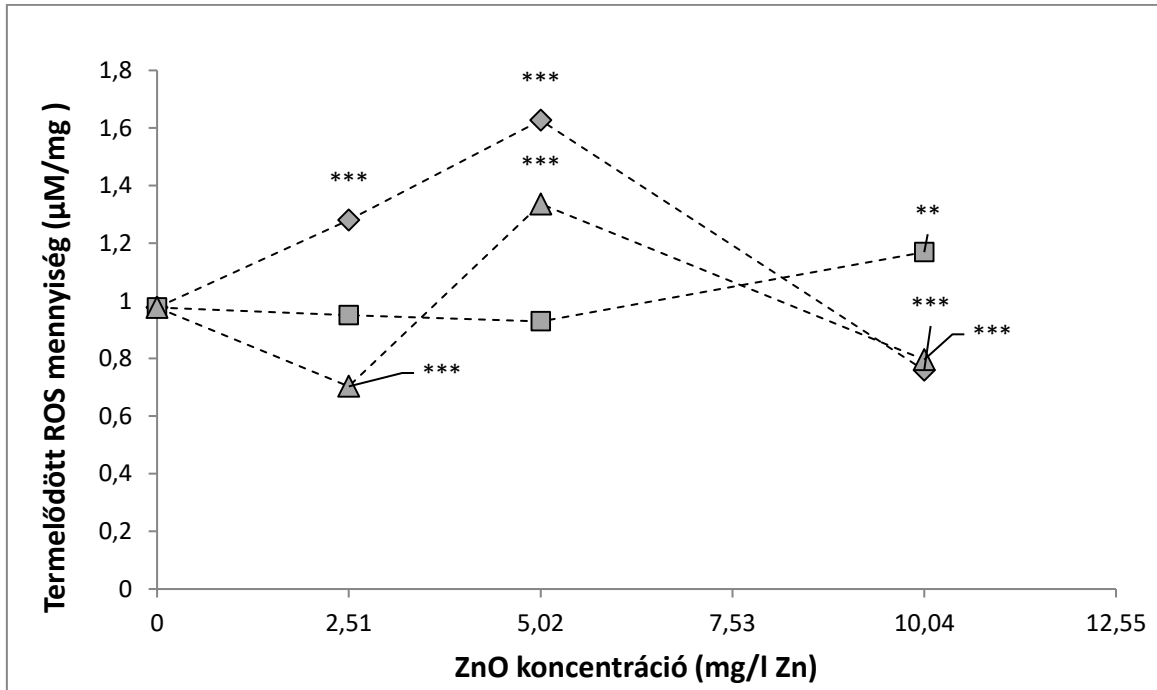
3.3.5. Sejten belüli reaktív oxigén gyök termelődés mérése

A reaktív oxigén gyök (ROS) mérés során kapott adatok esetében normális eloszlást tapasztaltam ($W=0,94$; $p>0,05$). A leggyakrabban 0,59-0,63 $\mu\text{M}/\text{mg}$ (kiugró érték: 1,07 $\mu\text{M}/\text{mg}$) között volt az állatcsoportok mért ROS tartalma a Milli-Q vizes kontrollcsoportoknál, és 0,74-1,09 $\mu\text{M}/\text{mg}$ között a NAC-os kontrollcsoportoknál. Az adatsorok összehasonlíthatósága érdekében külön-külön átlagot vontam. Ezáltal a statisztikai vizsgálatok elvégzésénél már az átlagok alapján korrigált értékekkel dolgoztam (Milli Q vizes kontroll: 0,69 $\mu\text{M}/\text{mg}$; NAC kontroll: 0,97 $\mu\text{M}/\text{mg}$). Az ábrákon is a korrigált adatokat tüntettem fel. A három önállóan mért anyag közül a keverék esetében tapasztaltam a legmagasabb, a 140 nm ZnO esetében a legalacsonyabb ROS termelődést (11. táblázat). Ebből kifolyólag a 140 nm ZnO a keveréktől ($LM_{DF:3,12}$: $t=2,24$ $p<0,05$) és a 15 nm ZnO-tól ($LM_{DF:3,12}$: $t=3,21$ $p<0,01$) is szignifikánsan különbözött (16. ábra). Koncentrációfüggő növekedést tapasztaltam a 15 nm ZnO és a keverék hatására termelődött ROS mennyiségben. A NAC hozzáadása kontrollcsoportok esetében magasabb mért oxigéngyök termelődés eredményezett (12. táblázat). A NAC jelenlétében teljesen más tendenciát tapasztaltam, mint az önmagukban használt anyagoknál (17. ábra). Ebben az esetben szignifikáns különbség nem volt az anyagok között. Mind a 140 nm ZnO, mind pedig a keverék esetében a 2,51 mg/l Zn koncentrációban kiugró ROS növekedés és utána erős csökkenés tapasztalható. A 140 nm ZnO-

nál önmagában és a NAC jelenlétében is a legmagasabb koncentrációban volt a legalacsonyabb mért ROS érték. Mivel a mérések párhuzamossal történtek és az NAC-el végzett vizsgálatok során egyes esetekben ki kellett zárni a párhuzamost (kiugró értékek, mérési hiba), így a 17. ábrán a szórás megjelenítésétől eltekintek.



16. ábra. A termelődött reaktív oxigén gyök mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$) 15 nm, 140 nm és a két anyag 50-50%-os keverékének (Mix) hatására (15 nm – □ –, 140 nm – ◇ –, Keverék – △ –). Koncentrációnként 2 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.



17. ábra. A termelődött reaktív oxigén gyök mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$) 15 nm, 140 nm és a két anyag 50-50%-os keverékének (Mix) hatására N-acetilcisztein jelenlétében. (15 nm + NAC – ■ –, 140 nm + NAC – ◆ –, Keverék + NAC – ▲ –). Koncentrációnként 2 db ismétlést használtam. Szignifikancia szintek jelölései:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Lineáris modell: anyagonként a kontroll (0 mg/l) és az egyes koncentrációk közötti eltérést mutatja.

11. táblázat. A 15 nm, 140 nm ZnO és a kettő 50-50%-os keverékének mért átlagos fluoreszcencia értékei. Mérésenként 2 ismétlést használtam. A ROS mennyiségeknél ($\mu\text{M}/\text{mg}$) a három vizsgálatban mért kontrollok átlagával korrigált adatok vannak feltüntetve.

	15 nm				140 nm				Keverék			
	Fluoreszcencia (490/515 nm)	Standard görbe (50 mM H_2O_2)	Teljes protein tartalom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standardizált ROS mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	Fluoreszcencia (490/515 nm)	Standard görbe (50 mM H_2O_2)	Teljes protein tartalom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standardizált ROS mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	Fluoreszcencia (490/515 nm)	Standard görbe (50 mM H_2O_2)	Teljes protein tartalom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standardizált ROS mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$)
Vak (-)	0,062 \pm 0,014	-	-	-	0,051 \pm 0,013	-	-	-	0,069 \pm 0,047	-	-	-
Kontroll	2,086 \pm 0,071	42,431 \pm 1,481	23,708 \pm 2,278	0,693 \pm 0	1,538 \pm 0,016	27,785 \pm 0,286	29,503 \pm 0,354	0,693 \pm 0	1,342 \pm 0,162	26,229 \pm 0,968	25,605 \pm 0,354	0,693 \pm 0
10,04 mg/l Zn	1,983 \pm 0,017	40,274 \pm 0,354	21,541 \pm 4,908	0,742 \pm 0,007	1,246 \pm 0,022	22,325 \pm 0,404	51,384 \pm 20,621	0,520 \pm 0,006	1,663 \pm 0,039	32,855 \pm 0,800	23,158 \pm 1,911	0,943 \pm 0,023
5,02 mg/l Zn	2,128 \pm 0,170	43,314 \pm 3,567	21,248 \pm 4,280	0,809 \pm 0,067	1,320 \pm 0,022	23,325 \pm 0,411	39,633 \pm 1,380	0,640 \pm 0,008	1,437 \pm 0,063	28,191 \pm 1,290	20,990 \pm 1,256	0,938 \pm 0,042
2,51 mg/l Zn	2,054 \pm 0,006	41,755 \pm 0,127	18,741 \pm 1,611	0,885 \pm 0,003	1,256 \pm 0,010	22,520 \pm 0,196	34,100 2,779	0,601 \pm 0,003	1,630 \pm 0,006	32,170 \pm 0,124	22,639 \pm 1,276	0,962 \pm 0,004
H_2O_2 (+)	2,445 \pm 0,077	49,956 \pm 1,622	-	-	2,724 \pm 0,168	49,963 \pm 3,135	-	-	1,270 \pm 0,026	24,755 \pm 0,542	-	-
APF + vak (-)	n.a.	-	-	-	1,364 \pm 0,002	24,542 \pm 0,040	-	-	2,492 \pm 0,031	49,952 \pm 0,643	-	-

12. táblázat. A 15 nm, 140 nm ZnO és a kettőnek az 50-50%-os keverékének mért átlagos fluoreszcencia értékei N-acetilcisztein jelenlétében. Mérésenként 2 ismétlés. Szórás nincs azokban az esetekben, ahol kizártam a kiugró értékeket. A ROS mennyiségeknél ($\mu\text{M}/\text{mg}$) a három vizsgálatban mért kontrollok átlagával korrigált adatok vannak feltüntetve.

	15 nm ZnO+NAC				140 nm+NAC				Keverék+NAC			
	Fluoreszcencia (490/515 nm)	Standard görbe (50 mM H_2O_2)	Teljes protein tartalom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standardizált ROS mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	Fluoreszcencia (490/515 nm)	Standard görbe (50 mM H_2O_2)	Teljes protein tartalom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standardizált ROS mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	Fluoreszcencia (490/515 nm)	Standard görbe (50 mM H_2O_2)	Teljes protein tartalom ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standardizált ROS mennyiség ($\mu\text{M}/\text{mg}$)
Vak (-)	0,069 \pm 0,008	-	-	-	0,062 \pm 0,006	-	-	-	0,062 \pm 0,006	-	-	-
Kontroll	1,464 \pm 0,047	26,229 \pm 0,968	25,605 \pm 0,354	0,807 \pm 0,030	1,241 \pm 0,020	25,022 \pm 0,434	23,826 \pm 5,337	0,563 \pm 0,010	1,241 \pm 0,020	25,022 \pm 0,434	23,826 \pm 5,337	0,563 \pm 0,010
NAC Kontroll	1,485 \pm 0,025	31,272 \pm 0,510	25,221 \pm 0,526	0,977 \pm 0	1,768 \pm 0,007	36,214 \pm 0,150	19,879 \pm 0,037	0,977 \pm 0	1,768 \pm 0,007	36,214 \pm 0,150	19,879 \pm 0,037	0,977 \pm 0
10,04 mg/l Zn	1,383 \pm 0,024	31,604 \pm 0,499	26,189 \pm 0,385	0,951 \pm 0,015	0,995 \pm 1,053	19,806 \pm 22,349	22,6365 \pm 2,586	1,281	1,461 \pm 0,025	29,694 \pm 0,537	19,193 \pm 4,870	0,703 \pm 0,013
5,02 mg/l Zn	1,916 \pm 0,039	26,762 \pm 0,795	22,696 \pm 2,507	0,929 \pm 0,028	1,264 \pm 1,740	25,520 \pm 36,934	14,8345 \pm 1,639	1,627	0,921 \pm 1,248	18,238 \pm 26,506	15,304 \pm 0,664	1,337
2,51 mg/l Zn	1,495 \pm 0,049	29,399 \pm 1,016	19,806 \pm 0,359	1,169 \pm 0,040	0,909 \pm 1,210	17,972 \pm 25,700	16,8685 \pm 12,335	0,759	1,242 \pm 0,016	25,048 \pm 0,341	14,574 \pm 3,245	0,796 \pm 0,011
H_2O_2 (+)	1,270 \pm 0,026	24,755 \pm 0,542	-	-	1,271 \pm 0,025	25,662 \pm 0,025	-	-	1,271 \pm 0,025	25,662 \pm 0,025	-	-
APF + vak (-)	2,492 \pm 0,031	49,952 \pm 0,643	-	-	2,417 \pm 0,062	49,990 \pm 0,062	-	-	2,417 \pm 0,062	49,990 \pm 0,062	-	-

4. DISZKUSSZIÓ

4.1. Baktériumközösségek vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

A vizsgálat során két, Japánban gyűjtött erdei talajminta baktériumközösségében történt változásokat hasonlítottam össze az általam vizsgált ZnO részecskék hatására. A nZnO által kifejtett hatások talajmintánként változóak voltak. A két talaj eltérő talajcsoportba tartozott, míg a Hiruzen-i minta vulkanikus eredetű, jól rétegzett, magas ásványi anyag és szerves anyag tartalmú (andosol), addig a Wakasugi-ból származó minta réteg nélküli tömörödött agyag és humusz keveréke, magas vas-és alumínium-oxid tartalommal (cambisol). Ez a különbség a két talaj kontrollcsoportjának a vizsgálatokor is kiütkezött, a Hiruzenben gyűjtött mintában már a totális biomassza is valamivel magasabb volt, viszont a gomba/baktérium aránynál jól látható, hogy a teljes gomba tartalom magasabb, mint a Wakasugi mintában (6-7. táblázat). Ez az arány állhat a talajokra kifejtett hatások különbözősége mögött, hisz a talajban élő baktériumközösségek legtöbb esetben érzékenyebben reagálnak a nanoszemcsés ZnO-ra, mint az ott élő gomba fajok (Dhanalakshmi et al., 2013; Gunalan et al., 2013; Navale et al., 2015). Emellett ezért is lehetett, hogy egyes koncentrációkban a Wakasugi talaj esetében biomassza csökkenést tapasztaltam.

A nZnO-nak általában diverzitás csökkentő és szerkezeti változás okozó hatása van a baktériumközösségekre (Akyol et al., 2019; Ge et al., 2011; Meli et al., 2016; Yamindago et al., 2019), de néhány vizsgálatnál teljes biomassza csökkenést is tapasztaltak (Ge et al., 2011; Meli et al., 2016). Biostimulációra nem volt példa a nanoforma esetében, viszont a nagyobb szemcseméretnél ez a hatás is előfordulhat, a Zn esszenciális elem volta miatt (Gajjar et al., 2009). Ez korrelál a Wakasugi talajminta 140 nm ZnO kezelés legalacsonyabb koncentrációjában bekövetkezett enyhe biomassza növekedésével, viszont a jelen kísérletben a 15 nm ZnO legmagasabb koncentrációjában is tapasztaltam ezt a hatást mindkét talaj típusnál. A vizsgálataim alátámasztják, hogy a magasabb gomba/baktérium aránnyal rendelkező talaj kevésbé érzékeny a nZnO kezelésre.

4.2. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

Ebben a tesztorozatban két különböző tesztközeg hatását vizsgáltam a mikro- és a mezofauna egy-egy indikátor fajára. Tekintélyes különbséget találtam a toxicitásban mindkét faj esetében. A vizsgált ZnO tesztanyagok toxicitása csökkent a gipsz közeg (*Folsomia candida*) és a talajoldat (*Panagrellus redidivus*) használatakor. Ezek alapján is igazolható, hogy a tesztközeg szignifikánsan befolyásolja a toxicitási tesztek kimenetelét.

4.2.1. *Panagrellus redivivus* toxicitási tesztek

Habár egyre több kísérlet foglalkozik a nZnO hatásaival környezetileg releváns talajállatokon, figyelembe véve több toxicitást befolyásoló tényezőt, mint az aggregáció (Pipan-Tkalec et al., 2010; Wang et al., 2009), a felületi bevonat (Fang et al., 2013), a pH (Waalewijn-Kool et al., 2013), az oldódás (Wu et al., 2019), az expozíció módja (Waalewijn-Kool et al., 2012), a morfológia (Stankovic' et al., 2013) és a fotoindukált hatások (Adams et al., 2006; Ma et al., 2011; Wu et al., 2012), a tesztelési közeg hatásának kutatására kevesebb vizsgálat irányul (Sávoly et al., 2016).

A kísérleteimben az általam használt koncentrációkban minden tesztanyag toxikusnak bizonyult a *Panagrellus redivivus*-ra, annak ellenére, hogy Boyd et al. (2003) kísérletében éppen ez a faj volt a legkevésbé érzékeny két másik baktérium fogyasztó fonálféreggel (*Pristionchus pacificus* and *C. elegans*) összehasonlítva. A teszt anyag itt CuCl₂ volt. A 24 órás LC₅₀ értékek a *C. elegans* fajra víz közegben 0,32 mg/l Zn (Khare et al., 2011), 2,2 mg/l Zn (Wang et al., 2009), 111 mg/l (Wah Chu & Chow, 2002) és 60-80 mg/l Zn (Ma et al., 2011) értékek között mozogtak más szerzők vizsgálataiban. A Milli-Q vízben végzett kísérleteim az alacsonyabb értékek közé tartoznak. Talajoldatot kevés fonálféreggel végzett kísérletben alkalmaznak tesztközegként. Sávoly et al. (2016) szignifikánsan alacsonyabb cink felvételt tapasztalt a talajoldat jelenlétében, víz közeggel összevetve, egy K-stratégista növénykárosító fonálféreg, a *Xiphinema vuittenezi* esetében. A közegek hatását vizsgáló kísérleteink során a ZnO részecskék kevésbé voltak toxikusak a talajoldatban. Ez a részecskék/oldott cink és a talaj különböző komponensei, mint a fulvosav (Miao et al., 2010), a humin sav (Bian et al., 2011; Kteeba et al., 2017) és a csersav (Li et al., 2011b) között fellépő interakciók révén következhetett be. A három közül a csersav csökkentette a legerősebben a nanoszemcsés ZnO toxicitását (Li et al., 2011b). A kutatásomban a talajoldat mind a két szemcseméretű ZnO esetében csökkentette a kioldódott ionok mennyiségét (7. táblázat). Az oldódást befolyásolhatta a talajoldat pH értéke (Milli-Q vízbe: 6-6,5 pH, Talajoldat: 7-7,5 pH), mivel a neutrális pH-n a legkisebb a kioldódott ionok mennyisége az oldatban (Avramescu et al., 2016). Emellett a talajszemcsék felületén is megkötődhetnek a nanorészecskék, ami által csökkenhetett a biológiai elérhetőségük. Ezt támasztja alá az, hogy a Zn ionos formája nagyságrendekkel toxikusabb volt, mint a két ZnO forma talajoldat közegben. Míg a ZnO részecskék megkötődhettek a szemcséken, ahogy azt a SEM képeken (5. ábra) is láthatjuk, addig a ZnCl₂ szabadon felvehető maradt az állatok számára. A kísérleteim alapján a talajoldat közeg erősen csökkenti a tesztelt 15 nm és 140 nm ZnO toxikus hatásait *Panagrellus redivivus* fajra.

4.2.2. *Folsomia candida* toxicitási tesztek

Kool et al. (2011) és Waalewijn-kool et al (2012, 2013) vizsgálatai alapján a nZnO-nak enyhén toxikus hatása van a *Folsomia candida* faj túlélésére (6400 mg/l Zn koncentrációban). Kutatásaik során főként a kioldódott ionoknak tulajdonítják a toxikus hatásokat, megállapítják, hogy emiatt az oldott cinkformáknak erősebb hatása van, mint a nanorészecskéknek. Emellett a közeg pH-jának (Miao et al., 2010; Waalewijn-Kool et al., 2013) és szerves anyag tartalmának (Waalewijn-Kool et al., 2014) erős befolyása van a cink ionok oldódására és ezáltal a toxicitásra. Manzo et al. (2011) elkerülési kísérletei is ezt támasztják alá, ahol a tesztelt ugróvillások kevésbé kerültek el a nanoszemcsés ZnO-ot, mint a ZnCl₂-ot. Ezeket az eredményeket a jelen kísérletek eredményei is megerősítik, habár a további kísérleteimből kiderül, hogy a nZnO toxicitását nem csak a Zn²⁺ oldódással lehet magyarázni. Fountain & Hopkin (2001) ugyanazt a módszert használta a különböző expozíciós útvonalak tesztelésére, mint amivel a kutatásaim alatt dolgoztam. A tesztelt anyagok között a nagyszemcsés cink is szerepelt, mellette kadmiummal, ólommal és rézzel is kísérleteztek. Az eredményeimmel egybehangzóan ők is azt tapasztalták, hogy a tesztelt fémek erősebb hatást fejtettek ki a *F. candida*-ra talajban, mint gipsz közegben táplálékba keverve. A talajban az ugróvillások jobban ki vannak téve a kutikuláris expozíciónak, emellett a gipsz közegen végzett vizsgálat során valószínűleg képesek elkerülni a kihelyezett szennyezett táplálékot. A mortalitási és reprodukciós eredmények alátámasztják, hogy a két expozíciós útvonal közül a gipsz közegen táplálékba helyezett 15 nm – a mortalitás esetében – , 15 és 140 nm ZnO – a reprodukció esetében – alacsonyabb a toxikus hatása a *Folsomia candida* fajra, mint a mesterséges talajba kevert anyagoknak.

4.3. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *Panagrellus redivivus*-ra

Vizsgálataim során az N-acetilcisztein sikeresen csökkentette a két különböző szemcseméretű ZnO toxikus hatásait a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajra. A NAC mitigáló hatását nano-fémoxidokra főképp emberi sejtek teszteléskor mutatták ki. Az erre vonatkozó vizsgálatok fő célja, hogy a rákkutatásban és egyéb emberi felhasználás során csökkentsék a ZnO nem kívánatos hatásait (El-Shorbagy et al., 2019; Liu et al., 2017; Wang et al., 2014). Emellett születtek vizsgálatok vízibolha (*Daphnia magna*) érzékenységre is, a NAC itt is csökkentette a toxicitást (Ma et al., 2014). Fonálférgek esetében a ZnO és a NAC kombinációját eddig nem vizsgálták, viszont más nanoanyag, pl.: az Al₂O₃ (Li et al., 2012) és a TiO₂ (Wu et al., 2012) toxikus hatásait sikeresen mitigálták NAC segítségével.

Konkréten az N-acetilciszteinnek a Zn kioldódásra gyakorolt hatására vonatkozóan szakirodalmi forrásokat nem találtam, viszont az anyag kelátképző tulajdonságait több esetben is részletesen ismertették (Flora & Pachauri, 2010; Giampreti et al., 2016; Rossignol, 2005). Az általam mért oldódási értékek szignifikánsan magasabbak voltak a NAC hozzáadásakor. Ez annak tulajdonítható, hogy a teljes Zn tartalmat mértük, így a NAC által komplexben tartott Zn részecskék is bekerültek az értékbe. Míg a két tesztelt ZnO részecskéből önállóan nagyjából azonos mennyiségű Zn oldódott ki, addig a NAC hozzáadása után szignifikánsan alacsonyabb értéket kaptam a nagyobb szemcseméretnél. A 15 nm ZnO-ból nagyobb arányban tudott a NAC ionokat megkötni és azáltal csökkentette jobban a toxicitását is. Ez feltételezhetően annak köszönhető, hogy a két anyag eltérő felületi töltés sűrűséggel, eloszlással és elektromos potenciállal rendelkezett, a különböző méret (Abbas et al., 2008; Holmberg et al., 2013) és morfológia (Andelman, 1995) miatt. Így az N-acetilcisztein a hozzá képest nagyobb részben ellentétes töltéssel rendelkező részecskéekkel alkotott inkább komplexet. A toxicitási teszteimben a NAC-nel kezelt kontroll csoportokban mindig nagyobb volt az elhullás, mint a Milli-Q vizes kontrollcsoportoknál. Ez annak tudható be, hogy – főleg magasabb koncentrációkban – a NAC önmagában is marginálisan toxikus lehet (Kadiyala et al., 2018; Mahmoudi et al., 2015). A kísérleteim rámutattak arra, hogy az N-acetilcisztein csökkenti a ZnO szemcsék toxicitását a *Panagrellus redivivus*-ra.

4.4. Reaktív oxigén gyök termelődés módszer értékelése

A módszerfejlesztés során sikerült a Sarasija et al. (2018) és Yoon et al. (2018) által leírt reaktív oxigéngyök mérést úgy módosítanom, hogy az általam használt teszt faj és indikátor anyag mellett használható és megismételhető módszer legyen. A tapasztalataim és fejlesztéseim nélkül a módszer nem volt használható. A fejlesztett módszert több alkalommal sikeresen alkalmaztam, így a jövőben fel tudom használni a sejten belül termelődött reaktív oxigéngyök mérésre APF indikátor használatával a *Panagrellus redivivus* teszt fajon.

4.5. Szemcseméretfüggő toxikus hatások és a háttérükben működő mechanizmusok értékelése

A pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálat során kiderült, hogy a gyártó által megadott 15 és 140 nm-es részecskeméretnek valójában 59 ± 31 és 174 ± 138 nm méreteknél felelnek meg. Emellett mind a két anyagban találhatóak nano- és nagyszemcsék, bár a részecskék számának 50%-át nem haladják meg, így még a 15 nm a nano- és a 140 nm a nagyszemcsés tartományba tartozik. Ennek ellenére ezek a méretek valószínűsíthetően befolyással voltak a kísérleteim eredményeire. Feltételezhető, hogy ha a nominális részecskeméret lett volna a valós, akkor az

önálló vizsgálatok során (tesztközegek és mitigációs ágens befolyása nélkül) a kisebb szemcseméret lett volna a toxikusabb, a viszonylag azonos toxikus hatással szemben, amit jelen esetben tapasztaltam. Viszont abban az esetben sem kizárható, hogy a talajoldat, a talajközegek és az N-acetilcisztein használatokkor a jelen vizsgálatokhoz képest eltérő eredményeket kapnék, tehát nem a 140 nm ZnO hatása lenne a toxikusabb. Emellett véleményem szerint a keveréknél még erősebb szinergikus toxicitás növekedést tapasztalnék, ha ténylegesen a megadott méretekkkel dolgoztam volna.

4.5.1. Baktériumközösség vizsgálata során

A két szemcseméret toxicitása között csak a Wakasugi talaj legalacsonyabb koncentrációjú kezelése során (160,69 mg/l Zn) találtam különbséget. A 15 nm-es méretű anyag volt toxikusabb ebben a koncentrációban. A mikrobákon végzett kutatások során több esetben nem volt toxicitásbeli különbség a szemcseméretek között (Read et al., 2016; Wu et al., 2019), egyes esetekben viszont találtak nanoreleváns toxikus hatásokat (Gajjar et al., 2009; Zhai et al., 2017).

4.5.2. Közegek és expozíciós útvonalak vizsgálata során

A nZnO-dal végzett kutatások során több esetben nem találtak különbséget a szemcseméretek toxikus hatása között (Kool et al., 2011; Ma et al., 2011; Waalewijn-Kool et al., 2012, 2013; Wang et al., 2009), amíg más vizsgálatokban kimutatták, hogy a nanoszemcsés forma a toxikusabb (Khare et al., 2011; Sávoly et al., 2016). Az egyik okként a nanoszemcsés ZnO magasabb toxicitása mögött, a nagyszemcsés formához képest nagyobb mérvű oldódást neveztek meg (Bian et al., 2011; David et al., 2012). Ezzel ellentétben az általam használt 140 nm ZnO magasabb toxicitást mutatott a talajoldat (*P. redidivus*) és a mesterséges talaj (*F. candida*) jelenlétében, mint a kisebb szemcseméretű párja. Valószínűsíthetjük, hogy a 15 nm ZnO erősebben és gyorsabban aggregálódott a talajszemcsék jelenlétében és ezáltal csökkenhetett a toxikus hatása. Ezt a hipotézist a kioldódott ionok vizsgálata is alátámasztja, mivel kevesebb cink ion volt található a 15 nm ZnO mintában, mint a nagyobb szemcsésben 48 órás inkubációt követően. Ugyanakkor a Milli-Q vizes közegben a 15 nm ZnO oldódása közel kétszerese volt a nagyobb szemcsésnek. Emellett a két anyag morfológiája is különbözött (15 nm ZnO gömb, 140 nm ZnO irreguláris), ami szintén okozhatta a toxicitásbeli különbséget (Ann et al., 2015; Tong et al., 2013). A vizsgálataim alapján az általam használt nagyobb szemcseméretű (140 nm) ZnO magasabb toxicitást gyakorolt a talajoldat közegben a *Panagrellus redidivus* és mesterséges talaj közegben a *Folsomia candida* fajra, mint a kisebb szemcseméretű ZnO (15 nm).

4.5.3. Reaktív oxigéngyök termelődés mennyiségének vizsgálata során

Nanoszemcsés ZnO vizsgálatok általában kimutatható a reaktív oxigéngyökök koncentrációtól függő termelődése (Huang et al., 2019; Liu et al., 2017; Song et al., 2010; Xia et al., 2008). Más fém-oxidokkal összehasonlítva a H₂O₂ termelődés közegfüggő, viszont a szuperoxid termelődés minden esetben a legmagasabb volt a nZnO-nál (Xia et al., 2008). Nano- és nagyszemcsés ZnO összehasonlítása során a legtöbb esetben tisztán látható szemcseméretfüggő hatást tapasztaltak, a kisebb szemcseméretű anyag esetében volt magasabb a termelődött mennyiség (Liu et al., 2017; Song et al., 2010). A vizsgálataim során a legnagyobb termelődött mennyiség 3 órás expozíciót követően a keverékben volt, a legkisebb pedig a 140 nm ZnO-ban. A NAC hozzáadásakor a reaktív oxigéngyökök jóval nagyobb mértékben termelődtek, mint önállóan, már a kontrollcsoportokban is. A szakirodalomban általában a ROS termelődés csökkenését tapasztalják NAC hatására (Wang et al., 2014). Feltételezhető, hogy a NAC által indukált GSH termelődés az általunk alkalmazott 3 órás ROS mérési expozíció alatt még nem indult be (Farbiszewski et al., 2000), így nem csökkenést tapasztaltam a ROS értékekben, hanem növekedést.

4.5.4. N-acetilcisztein alkalmazása során

A szemcseméretfüggő mitigációra kevés adatot sikerült találnom, mivel az ilyen jellegű vizsgálatoknál a legtöbb esetben kimaradt a nagyszemcsés kontroll (El-shorbagy et al., 2019; Wang et al., 2014; Yang & Ma, 2014). Liu et al. (2017) bár nano mérettartományba tartozó, de két különböző méretű ZnO részecske hatását hasonlították össze (18,5±1,2 nm és 47,1±5,1 nm ZnO) az emberi neuroblasztóma SHSY5Y sejt vonalra. Önállóan a kisebb szemcseméret volt a toxikusabb, a NAC hozzáadása mindkét szemcseméret toxicitását csökkentette. A mitigáció a 40 mg/l alatti koncentrációkban volt a legerősebb, e felett már csökkent hatást észleltek és a két szemcseméret toxicitás csökkenésében enyhe különbséget tapasztaltak. A nagyobb szemcseméret esetén volt kisebb a mitigáció mértéke, hasonlóan az általam végzett vizsgálatokhoz, ahol a 140 nm ZnO-nál tapasztaltam ezt az enyhébb hatást. Emellett, hasonlóan a jelen dolgozat kísérleteihez, Liu et al. (Liu et al., 2017) a nanoszemcsés ZnO anyagok hatásait egy ionos formában lévő Zn-kel a ZnCl₂-dal is összehasonlították. Habár ebben az esetben megfigyeltek mitigációt két alacsonyabb koncentrációban (122,9 µM és 245,7 µM ZnCl₂), de e felett a sejt túlélési aránya 10% alá csökkent még a NAC hozzáadása mellett is. Tehát jóval gyengébben hatott a NAC a ZnCl₂-ra, mint a nanoformákra, hasonlóan az én eredményeimhez. Ezen felül az általam használt ZnCl₂ koncentrációk a tesztrendszerben jelenlévő kioldódott Zn ion mennyiséget reprezentálták, így az anyagoknál önmagukban és NAC hozzáadásával is jól látható, hogy a két szemcseméretű ZnO

toxikus hatásainak hátterében nem csak az ionok és az ionok hatására termelődött ROS állnak, hanem további szemcseméret függő toxikus hatások is lehetnek. Ezek az eredmények korrelálnak Song et al. (2010) kísérleteivel, ahol kimutatták, hogy a kioldódott Zn^{2+} és a generált ROS mennyiség nem indukálhatott olyan mértékű toxicitást, mint amit tapasztaltak. Így feltételezéseik szerint is további toxicitási tényezőknek is fent kell állniuk az észlelt hatások eléréséhez. A kísérleteim alapján a NAC kevésbé hat az ionos toxicitásra. Emellett az általam használt két anyagra eltérő toxicitási mechanizmus jellemező, így itt a nagyobb szemcseméretű forma bizonyult toxikusabbnak.

4.5.5. Két anyag közötti interakció vizsgálata során

Két különböző nanoanyag keverésekor kimutattak mások is szinergisztikus toxicitás növekedést pl. $nZnO+nAg$ (Jafari et al., 2011); $nAu+nPt$ (Mott et al., 2007) és $nAg+nTiO_2$ (Li et al., 2011a). Egyes esetekben ezzel szemben a negatív hatások csökkenését tapasztalták. Nanoszemcsés ZnO és TiO_2 keverésekor toxicitás csökkenés lépett fel (Tong et al., 2015), ezt a hatást a TiO_2 felületén adszorbeálódott és ezáltal kevésbé felvehető Zn^{2+} csökkenésével magyarázták (Tong et al., 2014). A vizsgálataimban a két különböző szemcseméretű ZnO 50-50%-os keveréknél erős toxicitás növekedést tapasztaltam. A SEM képek alátámasztják, hogy mindkét anyag megtalálható az új keverékben, így egy új, a két másik anyag közötti átlag szemcsemérettel rendelkező ZnO -t sikerült létrehozni (130 ± 118 nm), amiben mind gömb, mind irreguláris alakú részecskék is jelen vannak. A keverék esetében mindkét anyagnál erősen szignifikánsan magasabb volt a Zn kioldódás és marginálisan a ROS termelődés is. A toxicitás növekedése fennállt az N-acetilcisztein hozzáadása mellett is, a keveréknél volt a legalacsonyabb mitigáló hatása a NAC-nak. A NAC vizsgálatok alapján az antioxidáns kevésbé befolyásolja a kioldódott ionok által okozott toxikus hatásokat. A keverékben másfélszer magasabb volt ezeknek a mennyisége, mint a két anyagnál külön-külön. Emellett az N-acetilcisztein ebből az anyagból tudott a legkevesebbet megkötni (Keverék < 140 nm < 15 nm). A részecskeeloszlásokból (2. ábra c-d) jól látható, hogy ~30%-ban a 140 nm ZnO -ban is találhatunk nano részecskéket (37-97 nm, ebből leggyakrabban a 37 nm fordul elő), így a kétféle anyag összekeverése okán megnőtt a 30 nm-es részecskék aránya a keverékben (15. ábra e). Emellett feltételezhetően a nagyobb részecskék diszpergáló hatást fejtenek ki a tesztrendszerre. A keverékben a részecskék inkább egymással aggregálódtak az eltérő töltés eloszlás miatt, mint a saját méretcsoportjukhoz tartozó részecskékkel. Ebből kifolyólag a 140 nm ZnO részecskék felületén aggregálódtak kisebb részecskék által fixálódott a nagy felület, nőtt a kioldódás, a reakcióképesség, ezáltal a toxicitás. Tehát a szemcsék összekeverésével a két

anyag különböző negatív hatásai (15 nm - részecskeméretből adódó, 140 nm - irreguláris morfológia) felerősítették egymást és ez állhat az erős toxikus hatások háttérében.

4.6. Következtetések összegzése

Általánosságban elmondható, hogy mindhárom talajjelölény csoport érzékenyen reagált a 15 és a 140 nm-es ZnO kezelésre. A legérzékenyebbek a mikrofaunába tartozó *Panagrellus redivivus* faj bizonyult Milli-Q vizes közegben. A vizsgálatokból kiderült, hogy a különböző közegek (Milli-Q víz, talajoldat), a tesztalajok fizikai és biológiai jellemzői és expozíciós útvonalak (orális, dermális és orális) is befolyásolják a tesztanyagok toxikus hatását. Emellett az N-acetilcisztein képes mitigálni mindkét vizsgált szemcseméret toxikus hatását.

Az általam átalakított módszerrel minden felhasznált anyagnál reaktív oxigéngyök termelődést tapasztaltam. Önállóan legmagasabbat a keverék esetében, legalacsonyabbat a 140 nm ZnO-nál. NAC hozzáadásával az anyag kismértékű toxicitásának következtében minden érték magasabb lett, mint önállóan. A vizsgálat elvégzéséhez magasabb expozíciós idő szükséges, hogy az antioxidáns ki tudja fejteni a hatását (Farbiszewski et al., 2000).

Az általam használt két szemcseméret közül több esetben is a 140 nm ZnO bizonyult toxikusabbnak (a talajoldat – *P. redivivus*; mesterséges talaj – *F. candida*; mitigációs vizsgálatok – *P. redivivus*). Ez indokolható a 15 nm ZnO részecskék gyorsabb és nagyobb mennyiségű kötődésével a talajszemcsékhez, morfológiai különbségekkel (Iswarya et al., 2015; Tong et al., 2013), töltés eloszlás különbséggel (Andelman, 1995) és azzal, hogy az N-acetilcisztein kevésbé tudott komplexeket képezni ezzel az anyaggal, mint a kisebb szemcseméretűvel. Valószínűleg ennek a háttérében is a morfológiai különbségek állnak.

Emellett a NAC hatása kevésbé befolyásolta a cink ionok toxikus hatását (Liu et al., 2017), ezért is lehetett, hogy a két anyag keveréke esetében, ahol szignifikánsan magasabb volt az oldódás, nem tapasztaltam statisztikailag igazolható mitigáló hatást.

Az általam használt ZnCl₂ koncentrációk a tesztrendszerben jelenlévő kioldódott Zn ion mennyiséget reprezentálták, ezáltal kimutatható, hogy a két szemcseméretű ZnO toxikus hatásai háttérében nem csak az ionok és az ionok hatására termelődött ROS állnak, hanem további szemcseméret függő toxikus hatások is lehetnek, hasonlóan Song et al. (2010) kísérleteihez.

A két anyag 50-50%-os keverésekor a toxikus hatások jelentős mértékben megnöttek, magasabb lett az oldott cink tartalom és a termelődött ROS mennyiség is. Feltételezhető, hogy az anyagok kémiai és fizikai tulajdonságai (több kisebb szemcse – magasabb biológiai elérhetőség, fixált nagy felületből, morfológiai szempontokból adódó toxicitás növekedés) egymás hatásait

felerősítve egy sokkal reaktívabb és a *P. redivivus* számára könnyebben felvehető elegyet képeztek.

A vizsgálatok alapján a 15 nm ZnO önmagában nagyobb mennyiségű ROS termelésére képes és a kioldódott ionok mennyisége is magasabb, mint a 140 nm ZnO esetében. Viszont, ha már egy további, a 15 nm ZnO toxikus hatásait semlegesítő tesztelemet is a rendszerbe helyezünk (pl. talaj, talajoldat tesztközeg, mitigáló ágens), rögtön a 140 nm ZnO lesz a toxikusabb. Ebből arra lehet következtetni, hogy ennél az anyagnál egy harmadik tényező is fennáll, amit kevésbé befolyásolnak a talajszemcsék és az N-acetilcisztein is. Feltételezhetően ez az anyag irreguláris részecske morfológiájából adódik.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Kimutattam, hogy a különböző szemcseméretű ZnO részecskék (15 nm és 140 nm) kevésbé toxikusak a *Panagrellus redivivus* fonálféreg tesztfajra talajoldat közegben, mint Milli-Q vízben. Ez a ZnO szemcsék és a talaj szerves és szervetlen összetevői közötti kapcsolat miatt alakult így. Emellett bizonyítottam, hogy a *Folsomia candida* ugróvillás teszt faj esetében a gipsz közegben történő csak orális expozíció csökkenti a 15 nm ZnO – a mortalitás esetében –, 15 és 140 nm ZnO – a reprodukció esetében – toxicitását a mesterséges talajhoz képest. A talajban az ugróvillások jobban ki vannak téve a kutikuláris expozíciónak is, emellett valószínűsíthető, hogy a gipszre kihelyezett szennyezett táplálékot képesek elkerülni.
- Mitigációs vizsgálatok során kiderítettem, hogy az N-acetilciszteinek toxicitást csökkentő hatása van a *Panagrellus redivivus* tesztfajra 15 nm és 140 nm ZnO jelenlétében. Mindazonáltal kimutattam, hogy N-acetilciszteinek nagyon alacsony a mitigáló hatása a ZnCl₂ és a két nanoanyag (15 nm és 140 nm nZnO) 50-50%-os keveréke használata esetén ugyanerre a tesztfajra.
- Sikert kimutatni az oldott Zn vizsgálat segítségével, hogy a Zn²⁺ okozta toxikus hatásokon felül fennáll további szemcseméret specifikus hatás a vizsgált anyagoknál (15 nm és 140 nm ZnO). Ez a hatás az ionos toxicitástól független ROS képződés és a szemcsék közvetlen fizikai interakciója okán alakulhat ki.
- Bizonyítottam, hogy több esetben nem a kisebb szemcseméretű, hanem a 140 nm ZnO volt a toxikusabb (a talajoldat – *P. redivivus*; mesterséges talaj – *F. candida*; mitigációs vizsgálatok – *P. redivivus*). Ez betudható lehet a 15 nm ZnO részecskék gyorsabb és nagyobb mennyiségű kötődésének a talajszemcsékhez, morfológiai különbségeknek és annak, hogy az N-acetilciszteinek kevésbé tudott komplexeket képezni ezzel az anyaggal, mint a kisebb szemcseméretűvel.

- Kimutattam, hogy a két anyag (15 nm és 140 nm ZnO) 50-50%-os keveréke szinergikusan toxikusabb, mint az anyagok önállóan alkalmazva.
- Kiegészítéseimmel létrehoztam egy, a *Panagrellus redivivus* tesztfajon használható, sejten belüli reaktív oxigéngyök (ROS) termelődés mérésére alkalmas módszert. A módszer segítségével kimutattam, hogy a ZnO részecskék minden esetben okoznak reaktív oxigén gyök termelődést a *Panagrellus redivivus* tesztfajnál és ez a mennyiség a legmagasabb a keverék és a legalacsonyabb a 140 nm ZnO esetében volt. Szakirodalomban a nZnO reaktív oxigén gyök termelődés indukáló hatását eddig még fonálféreg tesztstruktúrára nem vizsgálták.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A nanoanyagok alkalmazási területe rendkívül széles, emiatt az utóbbi 30 év alatt gyakorlatilag mindenhol megjelentek. A cink-oxid nanostruktúra az egyik leggyakrabban alkalmazott nanofém-oxid, sokoldalúsága és kompatibilitása miatt. Fotokatalitikus és kémiai aktivitása magas, ezért környezeti kármentesítésre, mint pl. talajremediációra vagy víztisztításra is alkalmazzák, ami által ezek az anyagok közvetve és közvetlenül is bekerülhetnek a talajba. A nanoszemcsés cink-oxid toxicitása több tulajdonságból eredhet, ilyen lehet a kioldódott cink-ionok, a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződése és egyéb potenciálisan a méretből adódó hatások, pl. az élőlények sejtjei és a nanorészecskék közötti közvetlen találkozások. A talajba jutó nanofémoxidok drasztikus változásokon mehetnek keresztül, kötődhetnek a talajszemcsékhez, bekövetkezhet agglomeráció vagy aggregáció a részecskék között, reakcióba léphetnek a talajban található szerves anyagokkal vagy a talajvízbe is oldódhatnak.

Vizsgálataim során mindhárom talajlakó élőlénycsoport indikátor fajai érzékenyen reagáltak a 15 és a 140 nm-es ZnO kezelésre. A különböző közegek (Milli-Q víz, talajoldat), a tesztalajok fizikai és biológiai jellemzői és expozíciós útvonalak (orális, dermális és orális) is befolyásolják a tesztanyagok toxikus hatását. Emellett az N-acetilcisztein, bár eltérő erősséggel, de képes volt mitigálni mindkét szemcseméret toxicitását (a 15 nm-esre erősebben hatott). Az általam használt két szemcseméret közül több esetben is a 140 nm ZnO bizonyult toxikusabbnak (a talajoldat közeg esetében *P. redidivus* tesztállatra; mesterséges talaj esetében *F. candida* tesztállatra; mitigációs vizsgálatok során *P. redidivus* tesztállatra). A két anyag 50-50%-os arányú keverése során a toxikus hatások erősen megnöttek, magasabb lett az oldott cink tartalom és a termelődött ROS mennyiség is. A legmagasabb ROS mennyiséget a keverék, a legalacsonyabbat a 140 nm ZnO kezelés hatására mértem. Az N-acetilcisztein kezelés sokkal kisebb mértékben a ZnCl₂-ra és a keverékre.

Összegezve elmondható: a vizsgálataim során sikerült kimutatnom, hogy az anyagoknak nincs, vagy csak enyhe biostimuláló hatása van a baktériumközösségekre, környezetileg releváns tesztközegben a fonálféreg tesztstruktúrára gyakorolt toxicitásuk csökken, ezzel szemben mesterséges talajközegben erősebb hatást fejt ki ugróvilla tesztstruktúrára, mint csak a táplálékba kihelyezve. A két anyag toxicitása nem egyértelműen elkülöníthető, viszont ha már egy másik faktor is szerepel a tesztrendszerben, egyértelműen a nagyobb szemcseméretű lesz a toxikusabb. A keverékkel történt kezelés során tapasztalt szinergikus toxicitás növekedés hátterében is az állhat, hogy a 15 nm ZnO kisebb szemcséi és a 140 nm ZnO irreguláris formái együtt sokkal

reaktívabb formát képeztek. A kioldódott ionok toxicitásával történő összehasonlítás arra enged következtetni, hogy számolnunk kell nanoreleváns hatásokkal is.

7. SUMMARY

The field of nanomaterial application is extremely broad, which has made these substances almost ubiquitous in the last 30 years. Zinc oxide nanostructure is one of the most commonly used nano-metal oxides due to its versatility. It has high photocatalytic and chemical activity, being suitable for environmental remediation or water treatment, which can directly and indirectly introduce these substances into the soil. The toxicity of nanoparticulate zinc oxide can be attributed to a number of properties such as dissolved zinc ions, formation of reactive oxygen species (ROS) and other potentially size-related effects, e.g. direct encounters between living cells and nanoparticles. Nano-metal oxides can undergo drastic changes in the soil, like binding to soil particles, forming agglomerates or aggregates, react with organic substances or dissolve into the groundwater.

During my investigations, all species showed a sensitive response to both the 15 and 140 nm ZnO treatments. Different test media (Milli-Q water, soil solution), physical and biological characteristics of test media and exposure routes (oral, dermal and oral) also influenced the toxic effects of these substances. In addition, N-acetylcysteine, although of different potency, was able to mitigate the toxicity of both particle sizes (15 nm more potent). In general, 140 nm ZnO was found to be more toxic (soil solution - *P. redidivus*; artificial soil - *F. candida*; mitigation studies - *P. redidivus*). The 50-50% mixture of the two substances resulted in a marked increase of the toxic effects. Moreover, in the case of the mixture, a higher dissolved zinc content and an increased amount of produced ROS were measured. The highest ROS content was observed from the mixture, the lowest one from the 140 nm ZnO. The N-acetylcysteine treatment had low affect on the toxic effects from ZnCl₂ and the mixture.

In conclusion, I have been able to show that the studied substances have no or hardly any biostimulatory effect on bacterial communities, their toxicity decrease in an environmentally relevant test medium (soil solution) on the nematode test organism and they exert a stronger effect if put into the artificial soil medium, than only into the food of the springtail test organism. The toxicity of the two substances is not clearly distinguishable, however if another factor is included in the test system, the one with the larger particle size will be the more toxic. This may also be the cause for the synergistic increase in toxicity in the case of the mixture. Together, the smaller particles of 15 nm ZnO and the irregular forms of 140 nm ZnO formed a much more reactive substance. A comparison of the toxicity of the dissolved ions suggests that there is a nano-relevant effect.

8. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

8.1. Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

- Kiss L. V.**, Hrács K., Nagy P. I., Seres A., (2015): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztszervezetekre. *Állattani Közlemények*. 100:(1-2) 77-88.
- Kiss L. V.**, Hrács K., Nagy P.I., Seres A. (2016): Nano szemcseméretű fém-oxidok hatásának értékelése a talajban élő kiemelt ökológiai jelentőségű mikroorganizmusokra. *Agrokémia és Talajtan* 65: (1) 115–134.
- Kiss, L. V.**, Hrács, K., Nagy, P. I., Seres, A. (2018): Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on *Panagrellus redivivus* (Nematoda) and *Folsomia candida* (Collembola) in Various Test Media. *International Journal of Environmental Research*. 12(2):233. (IF:1,48)
- Hrács, K., Sávoly, Z., Seres, A., **Kiss, L.V.**, Papp, I.Z., Kukovecz, K., Záray, Gy., Nagy, P.I. (2018): Toxicity and uptake of nanoparticulate and bulk ZnO in nematodes with different life strategies. *Ecotoxicology*. 1-11. (IF:2,49)
- Kiss, L. V.**; Boros G.; Seres, A.; Nagy, P. I.(2020): Nano szemcseméretű fém-oxidok kulcsfontosságú talajállat csoportokra gyakorolt hatásainak áttekintése. *Állattani Közlemények*. 105(1-2): 29-57.

Tudományos ismeretterjesztő publikációk:

- Kiss, L. V.**, Nagy, P.I., Seres, A. (2017): Nanoanyagok a talajéletben: Félelmetes parányok. *TermészetBúvár* 72: (2) 10-12.
- Kiss, L.V.** (2017): A nanoanyagok környezeti hatásai: Veszélyek és Lehetőségek. *Élet és Tudomány LXXII.*: (12) 361-363.

8.2. Szóbeli előadások az értekezés témájában

- Kiss L. V.**, Hrács K., Seres A., Nagy P.I. (2015): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztszervezetekre. Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztály, 2015. március 4.
- Nagy P., Hrács K., Seres., Sávoly Z., **Kiss L. V.**, Bakonyi G.: Nanoanyagok hatásvizsgálata talajállatokon. Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztály, 2015. október 7.

- Seres A., Hrác K., **Kiss L. V.**, Posta K., Nagy P.I. (2015): Nano-és nagyszemcsés cink-oxid hatásainak vizsgálata talajlakó szervezeteken. a Magyar Toxikológusok Társasága 2015. évi konferenciája, Harkány, 2015.10.14-16.
- Kiss L. V.** (2016): Mi a manó az a nano? II. Élettudományi Liftbeszéd Fesztivál, Eötvös Lóránt Tudományegyetem, Budapest, 2016. 03.05. A legjobb analógia témában: Különdíj
- Kiss L. V.**, Hrác K., Nagy P.I., Seres A. (2016): Többféle szemcseméretű cink-oxid és réz toxikus hatásainak vizsgálata szabadonélő fonálféreg tesztszervezeten. In: Fenesi A, László Z, Markó B (szerk.)17. Kolozsvári Biológus Napok. 98 p. Konferencia helye, ideje: Kolozsvár, Románia, 2016.04.08-2016.04.09. Kolozsvár: Babes-Bolyai Tudományegyetem, p. 44.
- Kiss, L.V.** ; Seres, A. ; Nagy, P.I. (2018): Nano cink-oxid toxicitása stimulált UV sugárzás alatt és az N-acetilcisztein toxicitás csökkentő hatása a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajra. In: TOX'2018 Tudományos Konferencia Program, kivonatok (2018) pp. 52-52. Paper: C1-2 , 1 p.
- Kiss, L. V.** (2019): Az UV fény és mitigációs eljárások hatása a különböző szemcseméretű ZnO toxicitására. ÚNKP Konferencia.

8.3. Poszterek az értekezés témájában

- Kiss L. V.**, Hrác K., Nagy P.I., Seres A.(2015): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztszervezetekre. V. Ökotoxikológiai Konferencia: előadás és poszter kötete. 46 p. Budapest, 2015.11.20.
- Kiss L. V.**, Hrác K., Nagy P.I., Seres A. (2016): The toxic effects of different particle sized zinc oxide on terrestrial springtail and nematode test organisms. XVII International Colloquium on Soil Zoology, Nara, 2016. 08. 22-26.
- Kiss L. V.**, Nagy P.I., Seres A. (2018): Photo-induced toxicity of zinc oxide nanoparticles and toxicity mitigation by N-acetylcysteine on a soil-living nematode: *Panagrellus redivivus*. 14th Central European Workshop on Soil Zoology, České Budějovice, Czech Republic, 2018.04.16-18.
- Kiss L. V.**, Hyodo F., Nagy P.I., Seres A. (2018): Differently sized zinc oxide nanoparticles effects on microbial biomass. SETAC Europe 28th Annual Meeting, Róma, Olaszország. 2018.05.13-17.

Kiss L. V., Sávoly Z., Seres A., Nagy P.I. (2019): Differently sized zinc oxide particles toxicity mitigation by N-acetylcysteine and mixed toxicity on a soil-living nematode: *Panagrellus redivivus*. SETAC Europe 29th Annual Meeting, Helsinki, Finnország. 2019.05.26-30.

8.4. Független publikációk

Nagy, Á.; **Kiss L. V.**; Nagy, P. I. ; Seres, A. (2016): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása a talajlakó *Enchytraeus albidus* tesztorganizmus túlélésére és reprodukciójára VI.

Ökotoxikológiai Konferencia: előadás és poszter kötete. 44 pp. Budapest, 2016.11.18.

Benjámín, B. ; Kaszap, A.; **Kiss, L. V.**; Boros, G.; Seres, A.; Nagy, P. I. (2018): *Preliminary investigations on the effect of irrigation water with high selenium content on different soil animals pp. 39-39. , 1 p.* In: Petra, Kokorova; Michala, Bryndova; Karel, Tajovsky (szerk.) 14th Central European Workshop on Soil Zoology Ceske Budejovice, Csehország (2018) p. 71

Jakusovszky, R. ; Petrikovszki, R. ; **Kiss, L.V.** ; Nagy, P. I. (2018): *Preliminary studies of walnut extract effects on different nematode feeding types* In: Wim Wesemael; Wim, Bert; Godelieve, Gheysen; Tina, Kyndt; Nicole, Viaene - 33th Symposium of the European Society of Nematologists, Abstract book (2018) p. 404

Jakusovszky, R. ; Petrikovszki, R. ; **Kiss, L.V.** ; Nagy, P. I. (2018): *Dióavarak ökotoxikológiai vizsgálata talajállatokon* Állattani Szakosztály 1047. ülése 2018-10-03 (ELTE, Budapest,)

Jakusovszky, R., Petrikovszki, R., **Kiss, L. V.**, Tóthné Bogdányi, F., Tóth, F., Nagy, P. I. (2019): Dióavar-kivonatok ökotoxikológiai vizsgálata növénykártevő fonálférgeken és más tesztorganizmusokon. *Növényvédelem* 80 (55):6.

9. MELLÉKLETEK

9.1. Irodalomjegyzék

- Abbas, Z., Labbez, C., Nordholm, S., Ahlberg, E. 2008. Size-Dependent Surface Charging of Nanoparticles. *J. Phys. Chem.*, *112*, 5715–5723. <https://doi.org/10.1021/jp709667u>
- Abbott, L., Murphy, D. 2003. *Soil biological fertility: A key to sustainable land use in agriculture* (L. Abbott & D. Murphy (eds.)). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6619-1>
- Adams, L. K., Lyon, D. Y., Alvarez, P. J. J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res.*, *40*, 3527–3532. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.004>
- Akyol, C., Ozbayram, E. G., Demirel, B., Onay, T. T., Ince, O., Ince, B. 2019. Linking nano-ZnO contamination to microbial community profiling in sanitary landfill simulations. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *26*, 13580–13591.
- Andelman, D. 1995. Electrostatic Properties of Membranes : The Poisson-Boltzmann Theory Electrostatic. In R. Lipowsky & E. Sackmann (Eds.), *Handbook of biological physics* (pp. 603–642). Elsevier.
- Anderson, R. V, Trofymow, J. A., Coleman, D. C., Reid, C. P. P. 1982. Phosphorus mineralization by a soil Pseudomonad in spent oil shale as affected by a Rhabditid nematode. *Soil Biol. Biochem.*, *14*, 365–371.
- Andrássy, I., Farkas, K. 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. Agricultural Publisher.
- Anjum, M., Miandad, R., Waqas, M., Gehany, F., Barakat, M. A. 2016. Remediation of wastewater using various nano-materials. *Arab. J. Chem.*, *12*, 4897–4919. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.10.004>
- Ann, L. C., Mahmud, S., Seeni, A., Bakhori, S. K. M., Sirelkhathim, A., Mohamad, D., Hasan, H. 2015. Structural morphology and in vitro toxicity studies of nano- and micro-sized zinc oxide structures. *J. Environ. Chem. Eng.*, *3*, 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.015>
- Avramescu, M., Rasmussen, P. E., Chénier, M., Gardner, H. D. 2016. Influence of pH , particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *24*, 1553–1564. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7932-2>

- Baalousha, M., Lead, J. R. 2009. Overview of Nanoscience in the environment. In J. R. Lead & E. Smith (Eds.), *Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology* (pp. 1–29). Blackwell Publishing Ltd.
- Baer, D. R., Engelhard, M. H., Johnson, G. E., Laskin, J., Jinfeng, L., Mueller, K., Munusamy, P., Thevuthasan, S., Wang, H., Washton, N., Elder, A., Baisch, B. L., Karakoti, A., Kuchibhatla, S. V. N. T., Moon, D. 2013. Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles : Important needs and challenging opportunities. *J. Vac. Sci. Technol. A*, *31*, 50820. <https://doi.org/10.1116/1.4818423>
- Bakonyi, G. G., Jurikova, T., Szekeres, L. L., Seres, A., Répási, V., Juríková, T., Szekeres, L. L., Balla, I. 2009. Új irányok a talajállatok ökotoxikológiájában. *Állattani Közlemények*, *94*, 3–17.
- Bakonyi, G., Nagy, P. I. 2000. Temperature- and moisture-induced changes in the structure of the nematode fauna of a semiarid grassland - patterns and mechanisms. *Glob. Chang. Biol.*, *6*, 697–707.
- Bandyopadhyay, S., Plascencia-villa, G., Mukherjee, A., Rico, C. M., José-Yacamán, M., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. 2015. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Sci. Total Environ.*, *515–516*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.014>
- Bardgett, R. D., Hobbs, P. J., Frostegård, Å. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol. Fertil. Soils*, *22*, 261–264. <https://doi.org/10.1007/BF00382522>
- Bian, S. W., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T., Grassian, V. H. 2011. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: Influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir*, *27*, 6059–6068. <https://doi.org/10.1021/la200570n>
- Bigorgne, E., Foucaud, L., Lapied, E., Labille, J., Botta, C., Sirguey, C., Falla, J., Rose, J., Joner, E. J., Rodius, F., Nahmani, J. 2011. Ecotoxicological assessment of TiO₂ byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.*, *159*, 2698–2705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.024>
- Borgonie, G., Garcíá-Moyano, A., Litthauer, D., Bert, W., Bester, A., van Heerden, E., Möller, C., Erasmus, M., Onstott, T. C. 2011. Nematoda from the terrestrial deep subsurface of

South Africa. *Nature*, 474, 79–82. <https://doi.org/10.1038/nature09974>

- Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E. 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *J. Hazard. Mater.*, 283, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>
- Boxall, A. B. A., Tiede, K., Chaudhry, Q. 2007. Engineered nanomaterials in soils and water : how do they behave and could they pose a risk to human health ? *Nanomedicine*, 2, 919–927.
- Boyd, W. ., Williams, P. . 2003. Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 2768–2774.
- Buchan, D., Gebremikael, N., Ameloot, N., Sleutel, S., de Neve, S. 2013. The effect of free-living nematodes on nitrogen mineralisation in undisturbed and disturbed soil cores. *Soil Biol. Biochem.*, 60, 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.022>
- Cattaneo, A. G., Gornati, R., Bernardini, G. 2009. Ecotoxicology of nanomaterials : the role of invertebrate testing. *Invertebr. Surviv. J.*, 6, 78–97.
- Chen, J., Ferris, H. 1999. The effects of nematode grazing on nitrogen mineralization during fungal decomposition of organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 1265–1279.
- Chen, Y., Guo, X., Feng, J., Lu, D., Niu, Z., Tou, F., Hou, L., Liu, M., Yang, Y. 2019. Impact of ZnO nanoparticles on the antibiotic resistance genes (ARGs) in estuarine water : ARG variations and their association with the microbial community. *Environ. Sci. Nano*, 6, 2405–2419. <https://doi.org/10.1039/c9en00338j>
- Chia, S. L., Leong, D. T. 2016. Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating. *Heliyon*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00177>
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C. W. 2006. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.*, 6, 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- Cohn, C. A., Pedigo, C. E., Hylton, S. N., Simon, S. R., Schoonen, M. A. A. 2009. Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochem. Trans.*, 10, 8. <https://doi.org/10.1186/1467-4866-10-8>
- Coll, C., Notter, D., Gottschalk, F., Sun, T., Som, C., Nowack, B. 2015. Probabilistic

environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). *Nanotoxicology*, *10*, 436–444.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1073812>

Dányi, L., Traser, G. 2008. Magyarország ugróvillásai. In *A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása* (pp. 21–28).

David, C. A., Galceran, J., Rey-Castro, C., Puy, J., Companys, E., Salvador, J., Monne, J., Wallace, R., Vakourov, A. 2012. Dissolution kinetics and solubility of ZnO nanoparticles followed by AGNES. *J. Phys. Chem.*, *116*, 11758–11767.

Dhanalakshmi, R., Pandikumar, A., Sujatha, K., Gunasekaran, P. 2013. Photocatalytic and antimicrobial activities of functionalized silicate sol–gel embedded ZnO–TiO₂ nanocomposite materials. *Mater. Express*, *3*, 291–300.

<https://doi.org/10.1166/mex.2013.1133>

Dimkpa, C., Britt, D. W., Mclean, J. E., Anderson, A. 2011. Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6 to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. *Environ. Pollut.*, *159*, 1749–1756.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.020>

Dunphy Guzman, K. A., Finnegan, M. P., Banfield, J. F. 2006. Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.*, *40*, 7688–7693.

El-Shorbagy, H. M., Eissa, S. M., Sabet, S., El-Ghor, A. A. 2019. Apoptosis and oxidative stress as relevant mechanisms of antitumor activity and genotoxicity of ZnO-NPs alone and in combination with N-acetyl cysteine in tumor-bearing mice. *Int. J. Nanomedicine*, *14*, 3911–3928.

Fang, T., Watson, J., Goodman, J., Dimkpa, C. O., Martineau, N., Das, S., Mclean, J. E., Britt, D. W., Anderson, A. J. 2013. Does doping with aluminum alter the effects of ZnO nanoparticles on the metabolism of soil pseudomonads? *Microbiol. Res.*, *168*, 91–98.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.09.001>

Farbiszewski, R., Witek, A., Skrzydlewska, E. 2000. N -acetylcysteine or trolox derivative mitigate the toxic effects of methanol on the antioxidant system of rat brain. *Toxicology*, *156*, 47–55.

Filser, J. 2002. The role of Collembola in C and N cycling in soil. *Pedobiologia*, *46*, 234–245.

https://blackboard.au.dk/bbcswebdav/pid-1871101-dt-content-rid-5374394_1/courses/BB-

Cou-UUVA-72097/Filser 2002.pdf

- Flora, S. J. S., Pachauri, V. 2010. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 2745–2788. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072745>
- Fountain, M. T., Hopkin, S. P. 2001. Continuous Monitoring of *Folsomia candida* (Insecta : Collembola) in a Metal Exposure Test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48, 275–286. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2007>
- Fountain, M. T., Hopkin, S. P. 2005. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 201–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130331>
- Freckman, D. W., Mankau, R., Ferris, H. 1975. Nematode Community Structure in Desert Soils : Nematode Recovery. *J. Nematol.*, 7, 343–346.
- Frostegard, A., Tunlid, A., Baath, E. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journa Microbiol. Methods*, 14, 151–163.
- Fu, P. p., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P. C., Yu, H. 2014. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species5. *J. Food Drug Anal.*, 22, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>
- Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D. W., Huang, W., Johnson, W. P., Anderson, A. J. 2009. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Biol. Eng.*, 3, 9. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-9>
- Gange, A. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi, Collembola and plant growth. *Trends Ecol. Evol.*, 15, 369–372. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01940-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01940-6)
- Garner, K. L., Suh, S., Keller, A. A. 2017. Assessing the Risk of Engineered Nanomaterials in the Environment: development and application of the nanoFate model. *Environ. Sci. Technol.*, 51, 5541–5551.
- Ge, Y., Schimel, J. P., Holden, P. A. 2011. Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 1659–1664.
- Gehrke, I., Geiser, A., Somborn-Schulz, A. 2015. Innovations in nanotechnology for water treatment. *Nanotechnology, Sci. Appl.*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.2147/NSA.S43773>
- Giampreti, A., Lonati, D., Ragghianti, B., Ronchi, A., Petrolini, V. M., Vecchio, S., Locatelli, C. A. 2016. N-acetyl-cysteine as effective and safe chelating agent in metal-on-metal hip-

impanted patients: Two cases. *Case Rep. Orthop.*, 2016, 1–7.

- Giese, B., Klaessig, F., Park, B., Kaegi, R., Steinfeldt, M., Wigger, H., von Gleich, A., Gottschalk, F. 2018. Risks , Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Sci. Rep.*, 8, 1565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19275-4>
- Giusti, A., Atluri, R., Tsekovska, R., Gajewicz, A., Apostolova, M. D., Battistelli, C. L., Bleeker, E. A. J., Bossa, C., Bouillard, J., Dusinska, M., Gómez-fernández, P., Grafström, R., Gromelski, M., Handzhiyski, Y., Jacobsen, N. R., Jantunen, P., Jensen, K. A., Mech, A., Navas, J. M., ... Haase, A. 2019. NanoImpact Nanomaterial grouping : Existing approaches and future recommendations. *NanoImpact*, 16, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100182>
- Gogos, A., Knauer, K., Bucheli, T. D. 2018. Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization : Current State , Foreseen Applications , and Research Priorities. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9781–9792. <https://doi.org/10.1021/jf302154y>
- Gogos, A., Moll, J., Klingenfuss, F., van der Heijden, M. Van Der, Irin, F., Green, M. J., Zenobi, R., Bucheli, T. D. 2016. Vertical transport and plant uptake of nanoparticles in a soil mesocosm experiment. *J. Nanobiotechnology*, 14, 40. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0191-z>
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., Nowack, B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 9216–9222.
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., Desimone, J. M. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 11613–11618.
- Gunalan, S., Sivaraj, R., Rajendran, V. 2013. Progress in Natural Science : Materials International Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, 22, 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2012.11.015>
- Guo, D., Wu, C., Jiang, H., Li, Q., Wang, X., Chen, B. 2008. Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 93, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.07.009>
- Gupta, V. K., Tyagi, I., Sadegh, H., Shahryari-ghoshekandi, R. 2015. Nanoparticles as

- Adsorbent ; A Positive Approach for Removal of Noxious Metal Ions : A Review. *Sci. Technol. Dev.*, *34*, 195–214. <https://doi.org/10.3923/std.2015.195.214>
- Hackenberger, D. K., Stjepanović, N., Lončarić, Ž., Hackenberger, B. K. 2019. Effects of single and combined exposure to nano and bulk zinc-oxide and propiconazole on *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere*, *224*, 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.189>
- Hagerbaumer, A., Höss, S., Heininger, P., Traunspurger, W. 2015. Experimental Studies with Nematodes in Ecotoxicology : An Overview. *J. Nematol.*, *47*, 11–27.
- Halbritter, A., Mogyoróssy, T. 2002. Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Analysis of Rhizosphere Bacterial Communities in a Peat Soil. *Agrokémia És Talajt.*, *51*, 1–2.
- Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K. M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., D, W. 2008. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*, *19*, 295103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/29/295103>
- Holmberg, J. P., Ahlberg, E., Bergenholtz, J., Hassellöv, M., Abbas, Z. 2013. Journal of Colloid and Interface Science Surface charge and interfacial potential of titanium dioxide nanoparticles : Experimental and theoretical investigations. *J. Colloid Interface Sci.*, *407*, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.06.015>
- Höss, S., Williams, P. L. 2009. Ecotoxicity Testing with nematodes. In M. Wilson & T. Kakoule-Duarte (Eds.), *Nematodes as Environmental Indicators* (pp. 208–224). CAB International.
- Hou, W., Westerhoff, P., Posner, J. D. 2013. Biological accumulation of engineered nanomaterials: a review of current knowledge. *Environ. Sci. Process. Impacts*, *15*, 103–122. <https://doi.org/10.1039/c2em30686g>
- Hrács, K., Sávolgy, Z., Seres, A., Kiss, L. V., Papp, I. Z., Kukovecz, Á., Zárny, G., Nagy, P. 2018. Toxicity and uptake of nanoparticulate and bulk ZnO in nematodes with different life strategies. *Ecotoxicology*, *8*, 1058–1068. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1959-8>
- Huang, C.-W., Li, S.-W., Liao, V. H.-C. 2019. Long-term sediment exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Nano Sci. Nano*, *6*, 2602–2614. <https://doi.org/10.1039/c9en00039a>
- Huang, J., Lemire, B. D. 2009. Mutations in the C . *elegans* succinate dehydrogenase iron – sulfur subunit promote superoxide generation and premature aging. *J. Mol. Biol.*, *387*, 559–

569. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.028>

Hufnagel, L., Bakonyi, G., Vásárhelyi, T. 1999. New approach for habitat characterization based on species lists of aquatic and semiaquatic bugs. *Environ. Monit. Assess.*, 58, 305–316.

Iswarya, V., Bhuvaneshwari, M., Ann, S., Iyer, S., Chaudhuri, G., Chandrasekaran, P. T., Bhalerao, G. M., Chakravarty, S., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. 2015. Combined toxicity of two crystalline phases (anatase and rutile) of Titania nanoparticles towards freshwater microalgae : *Chlorella* sp. *Aquat. Toxicol.*, 161, 154–169.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.006>

Jafari, A., Ghane, M., Arastoo, S. 2011. *Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales*. 5, 5465–5473. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.392>

Jayaseelan, C., Rahuman, A. A., Kirthi, A. V., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Bagavan, A., Gaurav, K., Karthik, L., Rao, K. V. B. 2012. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 90, 78–84.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.006>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., Danquah, M. K. 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials : history, sources , toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P. 2009a. Characterization of size , surface charge , and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.*, 11, 77–89. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>

Jiang, W., Mashayekhi, H., Xing, B. 2009b. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.*, 157, 1619–1625.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>

Kádár, I. 2008. A mikroelemkutatások eredményeiről, különös tekintettel a Cu és Zn elemekre. *Acta Agron. Óváriensis*, 50, 9–14.

Kádár, I. 2013. *Szennyvizek, iszapok, komposztok, szervesstrágyák a talajtermékenység szolgálatában* (P. Csathó, E. Draskovits, & Z. Szilágyi (eds.)). 9421549 Akaprint Nyomda Kft.

Kadiyala, U., Turali-Emre, E. S., Bahng, J. H., Kotov, N. A., VanEpps, J. S. 2018. Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant

Staphylococcus aureus (MRSA). *Nanoscale*, 10, 4927–4939.

<https://doi.org/10.1039/C7NR08499D>

Kahru, A., Dubourguier, H., Blinova, I., Ivask, A., Kasemets, K. 2008. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview. *Sensors*, 8, 5153–5170.

<https://doi.org/10.3390/s8085153>

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts II, L. J., Ischiropoulos, H. 2012. Free Radical Biology & Medicine Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes : challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, 52, 1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>

Khan, N. A., Khan, K. A., Islam, M. 2012. Water and Wastewater Treatment using Nanotechnology. In L. Khemani, M. Srivastava, & S. Srivastava (Eds.), *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives* (pp. 315–318).

<https://doi.org/10.1007/978>

Khare, P., Sonane, M., Pandey, R., Ali, S., Gupta, K. C., Satish, A. 2011. Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 7, 116–117. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1229>

<https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1229>

Kim, Y. H., Fazlollahi, F., Kennedy, I. M., Yacobi, N. R., Hamm-alvarez, S. F., Borok, Z., Kim, K., Crandall, E. D. 2010. Alveolar Epithelial Cell Injury Due to Zinc Oxide Nanoparticle Exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 182, 1398–1409.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0185OC>

Kiss, L. V, Boros, G., Seres, A., Nagy, P. I. 2020. Nano- fémoxidok kulcsfontosságú talajállat csoportokra gyakorolt hatása i nak áttekintése. *Állattani Közlemények*, 105, 29–57.

<https://doi.org/10.20331/AllKoz.2020.105.1-2.29>

Klironomos, J. N., Bednarczuk, E. M., Neville, J. 1999. Reproductive significance of feeding on saprobic and arbuscular mycorrhizal fungi by the collembolan, *Folsomia candida*. *Funct. Ecol.*, 13, 756–761.

Kool, P. L., Diez Ortiz, M., van Gestel, C. A. M. 2011. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles , non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environ. Pollut.*, 159, 2713–2719. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.021>

Krogh, P. H. 2008. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia*

candida and the results of a ringtest. In *Miljøprojekt*.

Krug, H. F. 2014. Nanosafety Research — Are We on the Right Track? *Angew. Chemie Int. Ed.*, 53, 12304. <https://doi.org/10.1002/anie.201403367>

Kteeba, S. M., El-adawi, H. I., El-rayis, O. A., El-ghobashy, A. E., Schuld, J. L., Svoboda, K. R., Guo, L. 2017. Zinc oxide nanoparticle toxicity in embryonic zebra fish : Mitigation with different natural organic matter. *Environ. Pollut.*, 230, 1125–1140. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.042>

Kumar, A., Dixit, C. K. 2017. Methods for characterization of nanoparticles. In S. Nimesh, R. Chandra, & N. Gupta (Eds.), *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* (p. 239). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>

Lavelle, P. 2002. Functional domains in soils. *Ecol. Res.*, 17, 441–450.

Laws, T. R., Smith, S. A., Smith, M. P., Harding, S. V, Atkins, T. P., Titball, R. W. 2005. The nematode *Panagrellus redivivus* is susceptible to killing by human pathogens at 37 °C. *FEMS Microbiol. Lett.*, 250, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.046>

Lehoczky, É. 2006. *Tartós műtrágyázás hatása a talajok nehézfém felhalmozására.*

Li, C., Zhang, H., Gong, X., Li, Q., Zhao, X. 2018. Synthesis, characterization, and cytotoxicity assessment of N-acetyl-L-cysteine capped ZnO nanoparticles as camptothecin delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 174, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.043>

Li, M., Noriega-Trevino, M. E., Nino-martinez, N., Marambio-jones, C., Wang, J., Damoiseaux, R., Ruiz, F., Hoek, E. M. V. 2011a. Synergistic Bactericidal Activity of Ag-TiO₂ Nanoparticles in Both Light and Dark Conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 8989–8995.

Li, M., Pokhrel, S., Jin, X., Mädler, L., Damoiseaux, R., Hoek, E. M. V. 2011b. Stability, bioavailability, and bacterial toxicity of ZnO and iron-doped ZnO nanoparticles in aquatic media. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 755–761. <https://doi.org/10.1021/es102266g>

Li, Y., Yu, S., Wu, Q., Tang, M., Pu, Y., Wang, D. 2012. Chronic Al₂O₃ -nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Hazard. Mater.*, 219–220, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.083>

Liu, J., Kang, Y., Yin, S., Song, B., Wei, L., Chen, L., Shao, L. 2017. Zinc oxide nanoparticles

induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size- dependent manner. *Int. J. Nanomedicine*, 12, 8085–8099.

Lu, H., Wang, J., Stoller, M., Wang, T., Bao, Y., Hao, H. 2016. An Overview of Nanomaterials for Water and Wastewater Treatment. *Adv. Mater. Sci. Eng.*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/4964828>

Ma, H., Bertsch, P. M., Glenn, T. C. ., Kabengi, N. J. ., Williams, P. L. 2009. Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 1324–1330.

Ma, H., Kabengi, N. J., Bertsch, P. M., Unrine, J. M., Glenn, T. C., Williams, P. L. 2011. Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans* : The importance of illumination mode and primary particle size. *Environ. Pollut.*, 159, 1473–1480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.013>

Ma, H., Wallis, L. K., Diamond, S., Li, S., Canas-carrell, J., Parra, A. 2014. Impact of solar UV radiation on toxicity of ZnO nanoparticles through photocatalytic reactive oxygen species (ROS) generation and photo-induced dissolution. *Environ. Pollut.*, 193, 165–172.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.027>

Ma, H., Williams, P. L., Diamond, S. A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environ. Pollut.*, 172, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.011>

Mahmoudi, G. A., Astraki, P., Mohtashami, A. Z., Ahadi, M. 2015. N-acetylcysteine overdose after acetaminophen poisoning. *Int. Med. Case Rep. J.*, 8, 65–69.

Manzo, S., Rocco, A., Carotenuto, R., Picione, F. D. L., Miglietta, M. L., Rametta, G., Francia, G. Di. 2011. Investigation of ZnO nanoparticles ' ecotoxicological effects towards different soil organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 18, 756–763. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0421-0>

Mattiasson, G. 2004. Analysis of Mitochondrial Generation and Release of Reactive Oxygen Species. *Cytom. Part A*, 62, 89–96. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20089>

Mckee, M. S., Filser, J. 2016. Environmental Science Nano on soil communities. *Environ. Sci. Nano*, 3, 506–533. <https://doi.org/10.1039/c6en00007j>

Mclaren, A., Valdes-Solis, T., Li, G., Tsang, S. C. 2009. Shape and Size Effects of ZnO Nanocrystals on Photocatalytic Activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 12540–12541.

Meli, K., Kamika, I., Keshri, J., Momba, M. N. B. 2016. The impact of zinc oxide nanoparticles

on the bacterial microbiome of activated sludge systems. *Nat. Publ. Gr.*, 6, 39176.

<https://doi.org/10.1038/srep39176>

Miao, A. J., Zhang, X. Y., Luo, Z., Chen, C. S., Chin, W. C., Santschi, P. H., Quigg, A. 2010.

Zinc oxide-engineered nanoparticles: Dissolution and toxicity to marine phytoplankton.

Environ. Toxicol. Chem., 29, 2814–2822. <https://doi.org/10.1002/etc.340>

Microsoft Corporation. 2010. *Microsoft Excel* (No. 2010). <https://office.microsoft.com/excel>

Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., Wuttke, S. 2019. Nanoparticle Characterization : What to

Measure ? *Adv. Mater.*, 31, 1901556. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>

Mott, D., Luo, J., Njoki, P. N., Lin, Y., Wang, L., Zhong, C. 2007. Synergistic activity of gold-

platinum alloy nanoparticle catalysts. *Catal. Today*, 122, 378–385.

<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.01.007>

Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., Thanh, N. T. K. 2018. Characterization Techniques for

Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties.

Nanoscale, 10, 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>

Nagano, T. 2009. Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen

Species. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 45, 111–124.

Navale, G. R., Thripuranthaka, M., Late, D. J., Shinde, S. S. 2015. Antimicrobial Activity of

ZnO Nanoparticles against Pathogenic Bacteria and Fungi. *JSM Nanotechnol.*

Nanomedicine, 3, 1033.

Ng, C. T., Yong, L. Q., Hande, M. P., Yu, L. E., Bay, B. H., Baeg, G. H. 2017. Zinc oxide

nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in

human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Nanomedicine*, 12, 1621–1637.

Nour-Eldein, N. H., Hassanin, E. A., El-sayed, W. M. 2017. Mitigation of Acute Aluminum

Toxicity by Sodium Selenite and N-Acetylcysteine in Adult Male Rats. *Biol. Trace Elem.*

Res., 183, 128–137. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1126-8>

Olesik, J. W. 1991. Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP/MS. *Anal. Chem.*, 63, 12A-

21A.

Ostrovsky, S., Kazimirsky, G., Gedanken, A. 2009. Selective Cytotoxic Effect of ZnO

Nanoparticles on Glioma Cells. *Nano Res.*, 2, 882–890. [https://doi.org/10.1007/s12274-009-](https://doi.org/10.1007/s12274-009-9089-5)

9089-5

- Pándics, T. 2008. A nanorészecskék környezetegészségügyi hatásainak elemzése. *Egészségtudomány*, 52, 6–25.
- Pappas, S., Turaga, U., Kumar, N., Ramkumar, S., Kendall, R. J. 2017. Effect of concentration of silver nanoparticles on the uptake of silver from silver nanoparticles in soil. *Int. J. Environ. Agric. Res.*, 3, 80–90. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-MAY-2017-12>
- Park, S. J., Park, Y. C., Lee, S. W., Jeong, M. S., Yu, K., Jung, H., Lee, J., Kim, J. S., Cho, M. 2011. Comparing the toxic mechanism of synthesized zinc oxide nanomaterials by physicochemical characterization and reactive oxygen species properties. *Toxicol. Lett.*, 207, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.011>
- Parkinson, S. V., Whittaker, J. B. 1978. Effects of collembolan grazing on fungal colonization of leaf litter. *Soil Biol. Biochem.*, 11, 529–535.
- Pati, R., Das, I., Mehta, R. K., Sahu, R., Sonawane, A. 2016. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. *Toxicol. Sci.*, 150, 454–472.
- Péntek, A., Fazekas, C. 2016. A cink hiányának kiváltó okai a talaj-növény rendszerben. *Acta Agrar. Kaposváriensis*, 20, 48–61.
- Petersen, E. J., Henry, T. B., Zhao, J., Maccuspie, R. I., Kirschling, T. L., Dobrovolskaia, M. A., Hackley, V., Xing, B., White, J. C. 2014. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 4226–4246.
- Petrikovszki, R., Doshi, P., Turóczy, G., Tóth, F., Nagy, P. I. 2019. Investigating the Side-Effects of Neem-Derived Pesticides on Commercial Entomopathogenic and Slug-Parasitic Nematode Products Under Laboratory Conditions. *Plants*, 8, 281. <https://doi.org/10.3390/plants8080281>
- Pipan-Tkalec, Z., Drobne, D., Jemec, A., Romih, T., Zidar, P., Bele, M. 2010. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology*, 269, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.004>
- Przybyszewska, M., Zaborski, M. 2009. The effect of zinc oxide nanoparticle morphology on activity in crosslinking of carboxylated nitrile elastomer. *EXPRESS Polym. Lett.*, 3, 542–552. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2009.68>
- R Core Team. 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for

Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

- Rajput, V. D., Minkina, T. M., Behal, A., Sushkova, S. N., Mandzhieva, S., Singh, R., Gorovtsov, A., Tsitsuashvili, V. S., Purvis, W. O., Ghazaryan, K. A., Movsesyan, H. S. 2018. Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: A review. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.*, 9, 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.12.006>
- Ramasamy, M., Das, M., An, S. S. A., Yi, D. K. 2014. Role of surface modification in zinc oxide nanoparticles and its toxicity assessment toward human dermal fibroblast cells. *Int. J. Nanomedicine*, 9, 3707–3718.
- Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D. G. 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7, 1063–1077.
- Rauscher, H., Roebben, G., Rauscher, H., Roebben, G., Sanfeliu, A. B., Emons, H., Gibson, N., Koeber, R., Linsinger, T., Rasmussen, K., Sintes, J. R., Sokull-klüttgen, B., Stamm, H. 2015. *Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term “nanomaterial”* (H. Rauscher & G. Roebben (eds.)). EUR– Scientific and Technical Research series. <https://doi.org/10.2788/678452>
- Read, D. S., Matzke, M., Gweon, H. S., Newbold, L. K., Heggelund, L., Ortiz, M. D., Lahive, E., Spurgeon, D., Svendsen, C. 2016. Soil pH effects on the interactions between dissolved zinc, non-nano- and nano-ZnO with soil bacterial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23, 4120–4128. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4538-z>
- Rivera-Gil, P., Jimenez de Aberasturi, D., Wulf, V., Pelaz, B., Pino, P. Del, Zhao, Y., De La Fuente, J. M., Ruiz De Larramendi, I., Rojo, T., Liang, X.-J., Parak, W. J. 2013. The Challenge To Relate the Physicochemical Properties of Colloidal Nanoparticles to Their. *Acc. Chem. Res.*, 46, 743–749. <https://doi.org/10.1021/ar300039j>
- Rossignol, D. A. 2005. The Use of N-Acetylcysteine as a Chelator for Metal Toxicity. In R. E. Frye & M. Berk (Eds.), *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine* (1st ed., pp. 169–179). ADIS. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5311-5>
- Rui, Q., Zhao, Y., Wu, Q., Tang, M., Wang, D. 2013. Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode *Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress responset. *Chemosphere*, 93, 2289–2296.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.007>

- Ruppert, E. E., Fox, R. S., Barnes, R. D. 2004. *Invertebrate zoology: A functional evolutionary approach*. (6th ed.). Thomson-Brooks/Cole.
- Ryu, W., Park, Y., Bae, H. C., Kim, J. H., Jeong, S. H., Lee, H., Son, S. W. 2014. ZnO nanoparticle induces apoptosis by ROS triggered mitochondrial pathway in human keratinocytes. *Mol. Cell. Toxicol.*, *10*, 387–391. <https://doi.org/10.1007/s13273-014-0043-6>
- Saito, R., Tamura, M., Matsui, H., Nagano, Y., Suzuki, H., Kaneko, T., Mizokami, Y., Hyodo, I. 2015. Qing Dai attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial reactive oxygen species in gastrointestinal epithelial cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, *56*, 8–14. <https://doi.org/10.3164/jcfn.14>
- Saliani, M., Jalal, R., Goharshadi, E. K. 2016. Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells. *Nanomedicine J.*, *3*, 1–14. <https://doi.org/10.7508/nmj.2016.01.001>
- Samoiloff, M. R. 1987. Nematodes as indicators of toxic environmental contaminants. In J. A. Veech & D. W. Dickson (Eds.), *Vistas on Nematology* (pp. 433–439).
- Samoiloff, M. R., Schulz, S., Jordan, Y., Denich, K., Arnott, E. 1980. A Rapid Simple Long-Term Toxicity Assay for Aquatic Contaminants Using the Nematode *Pannagrellus redivivus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, *37*, 1167–1174.
- Sarasija, S., Norman, K. R. 2018. Measurement of ROS in *Caenorhabditis elegans* Using a Reduced Form of Fluorescein. *Bio Protoc.*, *8*, 11. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2800.Measurement>
- Savin, M. C., Görres, J. H., Neher, D. A., Amador, J. A. 2001. Uncoupling of carbon and nitrogen mineralization : role of microbivorous nematodes q. *Soil Biol. Biochem.*, *33*, 1463–1472.
- Sávoly, Z., Buzanich, G., Pepponi, G., Strelí, C., Hrács, K., Nagy, P. I., Záráy, G. 2015. The fate of nano-ZnO and its bulk counterpart in the body of microscopic nematodes : An X-ray spectrometric study. *Microchem. J.*, *118*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.08.011>
- Sávoly, Z., Hrács, K., Pemmer, B., Strelí, C., Záráy, G., Nagy, P. I. 2016. Uptake and toxicity of nano-ZnO in the plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*: the role of dissolved zinc and nanoparticle-specific effects. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *23*, 9669–9678. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5983-4>

- Sávoly, Z., Nagy, P., Havancsák, K., Záray, G. 2012. Microanalytical investigation of nematodes. *Microchem. J.*, 105, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.021>
- Seres, A. 2009. *The role of mycorrhiza-collembola interactions in the nutrient uptake in maize. PhD dissertation.* Szent István University.
- Seres, A., Bakonyi, G. 2002. A talajlakó állatok és az endomikorrhiza-gombák közötti kapcsolatok szerepe a növények tápanyagellátásában. *Agrokémia És Talajt.*, 51, 535–546. <https://doi.org/10.1556/Agrokem.51.2002.3-4.17>
- Seres, A., Bakonyi, G. G., Posta, K. 2003. Ugróvillások (Collembola) szerepe a *Glomus mosseae* (Zygomycetes) arbuskuláris mikorrhiza gomba terjesztésében. *Állattani Közlemények*, 88, 535–546.
- Seres, A., Kiss, I., Nagy, P., Sály, P., Darvas, B., Bakonyi, G. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi colonisation of Cry3 toxin- producing Bt maize and near isogenic maize. *Plant Soil Environ.*, 60, 569–573.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Majima, H. J., Chem, J. B. 2003. Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *J. Biol. Chem.*, 278, 3170–3175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200>
- Sharma, D., Rajput, J., Kaith, B. S., Kaur, M., Sharma, S. 2010. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films*, 519, 1224–1229. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.08.073>
- Sharma, N., Jandaik, S., Kumar, S. 2016. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics : ciprofloxacin , ampicillin , fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. *Ann. Brazilian Acad. Sci.*, 88, 1689–1698.
- Shen, C., James, S. A., Jonge, M. D. De, Turney, T. W., Wright, P. F. A., Feltis, B. N. 2013. Relating Cytotoxicity , Zinc Ions , and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle – Exposed Human Immune Cells. *Toxicol. Sci.*, 136, 120–130. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft187>
- Shi, H., Gu, Y., Xie, Z., Zhou, Q. I., Mao, G. 2017. Mechanism of N-acetyl-cysteine inhibition on the cytotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in JB6 cells transfected with activator protein - 1. *Exp. Ther. Med.*, 13, 3549–3554. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4415>
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., Dasmawati, M. 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles : Antibacterial Activity and

Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.*, 7, 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

Sivakumar, P., Lee, M., Kim, Y.-S., Shim, M. S. 2018. Photo-triggered antibacterial and anticancer activities of zinc oxide nanoparticles. *J. Mater. Chem. B*, 6, 4852–4871. <https://doi.org/10.1039/C8TB00948A>

Sochová, I., Hofman, J., Holoubek, I. 2006. Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environ. Int.*, 32, 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.031>

Sokolov, S. V, Tschulik, K., Batchelor-, C., Jurkschat, K., Compton, R. G. 2015. *agglomeration and aggregation at the nanoscale Reversible or not? Distinguishing agglomeration and aggregation at the*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02639>

Song, W., Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L., Sun, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 199, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.10.003>

Srinivasan, J., Dillman, A. R., Macchietto, M. G., Heikkinen, L., Lakso, M., Fracchia, K. M., Antoshechkin, I., Mortazavi, A., Wong, G., Sternberg, P. W. 2013. The draft genome and transcriptome of *Panagrellus redivivus* are shaped by the harsh demands of a free-living lifestyle. *Genetics*, 193, 1279–1295. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.148809>

Stankovic', A., Dimitrijevic', S., Uskokovic', D. 2013. Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 1, 21–28.

Sun, S. Y. 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther.*, 9, 109–110. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.2.10583>

Sun, T., Bornhöft, N. A., Hungerbuehler, K., Nowack, B. 2016. Dynamic Probabilistic Modelling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 4701–4711. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05828>

Sun, T., Mitrano, D. M., Bornhöft, N. A., Hungerbuehler, K., Nowack, B. 2017. Envisioning nano release dynamics in a changing world: using dynamic probabilistic modelling to assess future environmental emissions of engineered nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.*, 51, 2854–2863. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05702>

Tielens, A. G. G. M. 2012. Large Molecules and Nanograins in Space. In A. S. Barnard & H. Guo (Eds.), *Nature's Nanostructure* (pp. 362–370). Pan Stanford Publishing.

- Tong, T., Fang, K., Thomas, S. A., Kelly, J. J., Gray, K. A., Gaillard, J. 2014. Chemical interactions between nano-ZnO and nano-TiO₂ in a natural aqueous medium. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 7924–7932.
- Tong, T., Shereef, A., Wu, J., Binh, C. T. T., Kelly, J. J., Gaillard, J.-F., Gray, K. A. 2013. Effects of Material Morphology on the Phototoxicity of Nano-TiO₂ to Bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 12486–12495. <https://doi.org/10.1021/es403079h>
- Tong, T., Wilke, C. M., Wu, J., Thanh, C. T., Kelly, J. J., Gaillard, J., Gray, K. A. 2015. Combined toxicity of nano-ZnO and nano-TiO₂: From single- to multi-nanomaterial systems. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 8113–8123. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02148>
- Tourinho, P. S., van Gestel, C. A. M., Lofts, S., Svendsen, C., Soares, A. A. M. V. M., Loureiro, S. 2012. Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, 1679–1692. <https://doi.org/10.1002/etc.1880>
- ToxRat®Solutions.GmbH. 2015. *Software for statistical evaluation of biotests in ecotoxicology. ToxRat Solutions GmbH, Germany, Alsdorf (2.08).*
- Waalewijn-Kool, P., Diez-Ortiz, M. 2013. *Ecotoxicological Assessment of ZnO Nanoparticles to 'Folsomia Candida'*. http://sesss07.setac.eu/embed/sesss07/Pauline_Waalewijn_Ecotoxicological_assessment_of_ZnO_nanoparticles_to_Folsomia_candida.pdf
- Waalewijn-Kool, P. L., Diez Ortiz, M., Van Gestel, C. A. M. 2012. Effect of different spiking procedures on the distribution and toxicity of ZnO nanoparticles in soil. *Ecotoxicology*, 21, 1797–1804. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0914-3>
- Waalewijn-Kool, P. L., Diez Ortiz, M., Van Straalen, N. M., Van Gestel, C. A. M., Diez, M., Van Straalen, N. M., Van Gestel, C. A. M. 2013. Sorption, dissolution and pH determine the long-term equilibration and toxicity of coated and uncoated ZnO nanoparticles in soil. *Environ. Pollut.*, 178, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.003>
- Waalewijn-Kool, P. L., Rupp, S., Lofts, S., Svendsen, C., van Gestel, C. A. M. 2014. Effect of soil organic matter content and pH on the toxicity of ZnO nanoparticles to *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 108, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.031>
- Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T., Kammer, F. Von Der. 2014. Spot the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment — Release, Behavior, and Fate *Angewandte. Angew. Chemie Int. Ed.*, 53, 2–24.

<https://doi.org/10.1002/anie.201405050>

- Wah Chu, K., Chow, K. L. 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat. Toxicol.*, *61*, 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00017-6)
- Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Yao, Z., Qin, M., Zheng, S., Lu, W. 2016. Where Does the Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles Come From : the Nanoparticles , the Ions , or a Combination of Both? *J. Hazard. Mater.*, *5*, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.066>
- Wang, H., Wick, R. L., Xing, B. 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO , Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Pollut.*, *157*, 1171–1177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.004>
- Wang, J., Deng, X., Zhang, F., Chen, D., Ding, W. 2014. ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Res. Lett.*, *9*, 117.
- Wang, K., Chen, S., Zhang, C., Huang, J., Wu, J., Zhou, H., Jin, L. 2018. Enhanced ROS production leads to excessive fat accumulation through DAF- 16 in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.*, *112*, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.07.017>
- Wardle, D. A., Hyodo, F., Bardgett, R. D., Yeates, G. W., Wardle, D. A., Hyodo, F., Bardgett, R. D., Yeates, G. W. 2011. Long-term aboveground and belowground consequences of red wood ant exclusion in boreal forest. *Ecology*, *92*, 645–656. <https://doi.org/10.1890/10-1223.1>
- Willner, M. R., Vikesland, P. J. 2018. Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants. *J. Nanobiotechnology*, *16*, 95. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0419-1>
- Wittmaack, K. 2011. Excessive Delivery of Nanostructured Matter to Submersed Cells Caused by Rapid Gravitational Settling. *ACS Nano*, *5*, 3766–3778.
- Wu, F., Harper, B. J., Harper, S. L. 2019. Comparative Dissolution , Uptake , and Toxicity of Zinc Oxide Particles in Individual Aquatic Species and Mixed Populations. *Environ. Toxicol. Chem.*, *38*, 591–602. <https://doi.org/10.1002/etc.4349>
- Wu, Q., Wang, W., Li, Y., Li, Y., Ye, B., Tang, M., Wang, D. 2012. Small sizes of TiO₂-NPs exhibit adverse effects at predicted environmental relevant concentrations on nematodes in a modified chronic toxicity assay system. *J. Hazard. Mater.*, *243*, 161–168.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.013>

- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Ma, L., Gilbert, B., Shi, K. H., Yeh, J. I., Zink, J. I., Nel, A. E. 2008. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*, 2, 2121–2134.
- Yamindago, A., Lee, N., Woo, S., Yum, S. 2019. Impact of zinc oxide nanoparticles on the bacterial community of *Hydra magnipapillata*. *Mol. Cell. Toxicol.*, 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13273-019-00058-5>
- Yang, Q., Ma, Y. 2014. Irradiation-Enhanced Cytotoxicity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Int. J. Toxicol.*, 33, 187–203. <https://doi.org/10.1177/1091581814529168>
- Yazdi, A. S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S. K., Tardivel, A., Couillin, I. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *PNAS*, 107, 19449–19454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008155107>
- Yeates, G. W., Bongers, T., Goede, R. G. M. D. E., Freckman, D. W., Georgieva, S. S. 1993. Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera--An Outline for Soil Ecologists. *J. Nematol.*, 25, 315–331.
- Yeo, M., Nam, D. 2013. Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environ. Pollut.*, 178, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.040>
- Yoon, D. S., Lee, M., Cha, D. S. 2018. Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. *Bio Protoc.*, 8, 1–9.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2774.Measurement>
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil : a review. *Biol. Fertil. Soils*, 29, 111–129.
- Zhai, Y., Hunting, E. R., Wouterse, M., Peijnenburg, W. J. G. M., Vijver, M. G. 2017. Importance of exposure dynamics of metal-based nano-ZnO, -Cu and -Pb governing the metabolic potential of soil bacterial communities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 145, 349–358.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.031>
- Zhang, P., Cui, H., Zhong, X., Li, L. 2007. Effect of nTiO₂ semiconductor sol on prevention from plant diseases. *Nanoscience*, 12, 1–6.

Zhao, X., Wang, S., Wu, Y., You, H., Lv, L. 2013. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity , oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, 136–137, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.019>

9.2.További mellékletek

1. táblázat. Hiruzen és Wakasugi erőből gyűjtött talajminták vízkapacitás (WHC) mérése, WHC 60% meghatározása és az annak eléréséhez hozzáadott vagy elvett vízmennyiség.

	Hiruzen	Wakasugi
Gyűjtött talaj - 3 g száraz talaj tartalom - (Nedvesség tartalom %)		
	6,84 g (56,12%)	9,11 g (67,07%)
	6,84 g (56,17%)	8,97 g (66,58%)
	6,79 g (55,87%)	9,03 g (66,79%)
WHC (100%)		
	2,40	3,09
	2,35	3,04
	2,49	3,07
WHC (60%)		
	1,45	1,85
	1,42	1,82
	1,49	1,85
Vizes talaj (WHC 60%)		
	7,34 g	8,56 g
	7,25 g	8,47 g
	7,49 g	8,54 g
Hozzáadott vagy szárított víz/oldat mennyiség a WHC 60% elérésére		
	+ 0,50 g	-1,07 g (+ 0,53 g)
	+ 0,40 g	-1,03 g (+ 0,53 g)
	+ 0,68 g	-1,02 g (+ 0,53 g)

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Számtalan embernek tartozom köszönettel, hogy eljuthattam a Doktori Disszertációm befejezéséhez. Először is a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszéken dolgozó munkatársaimnak szeretnék köszönetet mondani, akik biztosították számomra a nyugodt, baráti légkört és ezáltal szervesen hozzájárultak a kutatásaim sikerének.

Köszönettel tartozom a Campus Mundi (CM-SMP-SH/137024/2016; CM-SMR/277859/2018) és a Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj (NTP-NFTÖ-16-0588) pályázatoknak, segítségükkel eljuthattam Okayamába és az ott végzett kísérletek által még inkább megismerhettem az általam vizsgált nanoanyagokat. Rendkívül sok segítséget kaptam az ottani konzulensemtől, Dr. Fujio Hyodo-tól, így neki is köszönettel tartozom. Emellett a Campus Mundi ösztöndíj segítségével egy olyan konferencia sorozatot ismerhettem meg Rómában (SETAC EUROPE), ami teljesen átalakította a gondolkodásmódomat.

Az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-18-3-III-SZIE-7) ösztöndíjat szolgáltató Emberi Erőforrások Minisztériumának is köszönettel tartozom, hogy anyagilag támogatta a munkáimat.

Szeretnék még köszönetet mondani mindenkinek, akik segítettek és tanácsokkal láttak el a kísérleteim elvégzése során, különösképp Dr. Sávolgy Zoltánnak, Dr. Kukovecz Ákosnak, Dr. Ács Andrásnak, Dr. Dankházi Zoltánnak, Dr. Kuki Ákosnak, Dr. Horváth Márknak, Dr. Hórvölgyi Zoltánnak és Ványiné Surman Ildikónak. Mellettük Dr. Bakonyi Gábornak is köszönettel tartozom, aki/mert/mivel rendkívül jó ötletekkel és tanácsokkal látott el a munkám során.

Köszönöm előre is az opponensek munkáját, rendkívül nagy segítséget nyújtanak a munkám kiteljesedéséhez.

Köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást és a kitartást, hogy a legnehezebb órákban is mellettem álltak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm két témavezetőmnek, Dr. Seres Anikónak és Dr. Nagy Péter Istvánnak a kitartó munkáját, hogy a megfelelő irányba terelgessenek és a rengeteg segítséget és tanácsot, amikkel kutatásaim és publikációim megvalósulhattak.