

Szent István Egyetem

Nagyszemcsés és nano cink-oxid hatásai különböző életmenet-stratégiájú fonálférgekre; *Xiphinema vuittenezi* és *Panagrellus redivivus*

Hrács Krisztina

Gödöllő
2020

A doktori iskola

megnevezése: SZIE Biológiai Tudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológia tudományok

vezetője: Dr. Nagy Zoltán
egyetemi tanár, DSc
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Növénytani és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető: Dr. Nagy Péter István
egyetemi docens, PhD
Állattudományi Alapok Intézet
Állattani és Állatökológiai Tanszék

.....
Dr. Nagy Zoltán jóváhagyása

.....
Dr. Nagy Péter István
jóváhagyása

Ez az értekezés 9 példányban készült. Ez a ... számú példány.



„Mi a tudomány?

Kornél!

- A lényeggel foglalkozik, és a kíváncsiságot jelenti. A kíváncsiság pedig az emberi értelem szenvedélye.”

Tudósok: Mi a tudomány



Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék	1
Táblázatok jegyzéke.....	2
Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
1.1 Célkitűzések.....	7
2 Irodalmi áttekintés.....	9
2.1 Fonálférgék	9
2.2 Fonálférgék szerepe ökotoxikológiai kutatásokban.....	9
2.3 Cink-oxid	11
2.4 Nanotechnológia	13
2.5 Nanoanyagok toxikus hatásai.....	14
2.6 Totálreflexiós röntgenfluoreszcencia spektrometria	16
3. Anyag és módszer	18
3.1 Tesztstruktúrák	18
3.1.1 <i>Xiphinema vuittenezi</i>	18
3.1.2 <i>Xiphinema vuittenezi</i> kinyerése a talajból.....	19
3.1.3 <i>Panagrellus redivivus</i>	21
3.2 Kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett vizsgálatok	23
3.2.1 Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO	23
3.2.2 Toxicitási tesztek.....	23
3.2.3 Elemfelvételi vizsgálatok.....	25
3.2.4 Cinkleadás vizsgálata.....	27
3.2.5 Talajoldat készítése	27
3.3 Célzottan előállított cink-oxiddal végzett vizsgálatok	29
3.3.1 ZnO előállítási és karakterizálási folyamata	29
3.3.2 Célzottan előállított ZnO részecskék jellemzői	30
3.3.3 Toxicitási tesztek.....	32
3.3.4 Elemfelvételi vizsgálatok.....	32
3.4 Eredmények értékelése	33
4. Eredmények	34
4.1 Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO hatásai.....	34
4.1.1 Toxicitási tesztek eredményei, <i>Xiphinema vuittenezi</i>	34
4.1.2 Elemfelvételi vizsgálatok eredményei talajoldat jelenlétében, <i>Xiphinema vuittenezi</i> .	35
4.1.3 Cinkleadás vizsgálatának eredményei	36
4.1.4 Toxicitási tesztek eredményeim, <i>Panagrellus redivivus</i>	38



4.2 Célzottan előállított ZnO hatásai	39
4.2.1 Toxicitási tesztek eredményei	39
4.3 Célzottan előállított ZnO elemfelvételi vizsgálatok eredményei	41
4.3.1 Cinktartalom	41
4.3.2 Káliumtartalom	42
4.3.3 Kalciumtartalom	42
4.3.4 Réztartalom	43
4.3.5 Vastartalom	44
4.3.6 Foszfortartalom	44
4.3.7 Kéntartalom	45
4.4 Új tudományos eredmények	46
5. Következtetések és javaslatok	47
5.1 Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO hatásai	47
5.1.1 Toxicitás	47
5.1.2 TXRF vizsgálatok eredménye	48
5.2 Célzottan előállított ZnO hatásai	49
5.2.1 Toxicitás	49
5.2.2 Elemfelvételi vizsgálatok	52
6. Összefoglaló	54
7. Summary	56
8. Irodalomjegyzék	58
9. Köszönetnyilvánítás	68



Ábrajegyzék

1. ábra Felület/térfogat arány kapcsolata a részecske átmérővel (Lau és M. Piah (2011)).....	5
2. ábra Természetben előforduló cinkit (J.A. Davidson felvétele, forrás: http 2)	12
3. ábra Nano- és bulk-ZnO-ra kapott L(E)C50 koncentrációk különböző tesztszervezetek.....	15
4. ábra TXRF spektrométer felépítése (Sávoly Zoltán 2010)	17
5. ábra Kifejlett <i>X. vuittenezi</i> nőtény, kiöltött szájszuronnal. B: Juvenilis korú <i>X. vuittenezi</i> elülső testvége. 60x nagyítás (Saját felvételek)	19
6. ábra Jobbra kifejlett <i>X. vuittenezi</i> nőtény és balra juvenilis nőtény a futtatás után sztereomikroszkóp alatt.....	20
7. ábra <i>X. vuittenezi</i> kifejlett nőtény, kiöltött szájszuronnal (200x nagyítás). A kép jobb szélén látható a tesztek során az állatok mozgásra használt műanyag eszköz vége (Sávoly Zoltán felvétele).....	21
8. ábra <i>P. redivivus</i> kifejlett nőtény, (60x nagyítás, saját felvétel).....	21
9. ábra <i>P. redivivus</i> kifejlett nőtény farokvége, (600x nagyítás, saját felvétel).....	22
10. ábra Nagyszemcsés (bulk)(A) és nanoszemcsés (nano)(B) ZnO (Sigma-Aldrich) (Sávoly Zoltán SEM felvételei)	23
11. ábra <i>X. vuittenezi</i> kifejlett nőtény teljes állat mikroszkóp alatt készült képe a tömegbecsléshez,.....	26
12. ábra <i>P. redivivus</i> kifejlett nőtény teljes állat mikroszkóp alatt készült képe a tömegbecsléshez 18,8x nagyításban, illetve alul a legnagyobb testátmérő képe 52,5x nagyításban. (Saját felvételek)	26
13. ábra Célzottan előállított nano-ZnO (A) és bulk-ZnO (B) TEM képe.....	30
14. ábra Nano-ZnO és bulk-ZnO részecskék részecskeméret-eloszlása TEM-mel meghatározva	31
15. ábra Nano-ZnO és bulk ZnO röntgendiffraktogramok	31
16. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk-ZnO hatása <i>Xiphinema vuittenezi</i> mortalitására 24 órás expozíciós idő után	34
17. ábra <i>X. vuittenezi</i> által leadott cink mennyiségek Milli-Q vízben, 50 mg/l koncentrációjú ZnO szuszpenzióval kezelt állatok esetén.	37
18. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO szuszpenziók, illetve ZnSO ₄ hatásai <i>P. redivivus</i> mortalitására 24 órás expozíció esetén	38
19. ábra <i>X. vuittenezi</i> mortalitása 24 órás expozíció után	39
20. ábra <i>P. redivivus</i> mortalitása 24 órás expozíció után	40
21. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk- ZnO szuszpenziók oldott cink tartalma, különböző pH tartományban (Forrás: Sávoly et al., 2016)	47
22. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk-ZnO mortalitásra gyakorolt hatása 24 órás expozíciós esetén az oldott cink mennyiségének függvényében.....	48



Táblázatok jegyzéke

1. táblázat <i>X. vuittenezi</i> kifejlett nőstények morfológiai méretei (Andrássy-Farkas, 1988).....	18
2. táblázat Talajminták tulajdonságai <i>X. vuittenezi</i> fonálféreg gyűjtési helyéről.....	19
3. táblázat <i>Xiphinema vuittenezi</i> gyűjtési helyéről származó talajoldat fajlagos vezetőképessége, kémhatása és az elemek koncentrációja.....	28
4. táblázat Kereskedelmi forgalomban kapható bulk-ZnO hatása <i>Xiphinema vuittenezi</i> mortalitására 96 és 168 órás expozíciós idő után.....	35
5. táblázat <i>X. vuittenezi</i> nőstény fonálféreg testének cinktartalma 24 órás expozíciós idő után, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-t tartalmazó talajoldatban	35
6. táblázat <i>X. vuittenezi</i> nőstény fonálféreg testének elemtartalma 24 órás expozíciós idő után, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-t tartalmazó talajoldatban	36
7. táblázat Nano-ZnO és bulk-ZnO LC ₁₀ és LC ₅₀ értékei (mg/l) <i>P. redivivus</i> 24 órás expozíciót követően	38
8. táblázat Nano-ZnO és bulk-ZnO LC ₁₀ és LC ₅₀ értékei 24 órás expozíció után.....	40
9. táblázat Kezeletlen <i>X. vuittenezi</i> és <i>P. redivivus</i> egyedek elemtartalmának összesítő táblázata	41
10. táblázat Fonálféreg cinktartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	41
11. táblázat Fonálféreg káliumtartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	42
12. táblázat Fonálféreg kalciumtartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	43
13. táblázat Fonálféreg réztartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	43
14. táblázat Fonálféreg vastartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	44
15. táblázat Fonálféreg foszfortartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	44
16. táblázat Fonálféreg kén tartalma <i>X. vuittenezi</i> (A) és <i>P. redivivus</i> (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.....	45



Rövidítések jegyzéke

ANOVA	Varianacianalízis (AN alysis Of V ariance)
Bulk-ZnO	Nagyszemcsés cink-oxid
CeO ₂	Cérium-oxid
ECHA	Európai Vegyi anyag-ügynökség (E uropean C hemicals A gency)
EPMA	E lectron P robe M icro-analyzer
HNO ₃	Salétromsav
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (I nternational O rganization for S tandardization)
LC ₅₀	Közepes halálos koncentráció (50% L ethal C oncentration)
Nano-ZnO	Nano szerkezetű cink-oxid
REACH	Vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról szóló rendelet (R egistration, E valuation, A uthorisation and R estriction of C hemicals)
ROS	Reaktív oxigén szabadgyökök (R eactive O xygen S pecies)
SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp (S canning E lectron M icroscope)
SzIE	S zent I stván E gyetem
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkóp
TiO ₂	Titán-dioxid
TXRF	Totálreflexiós röntgenfluoreszcencia (T otal R eflection X -ray F luorescence)
XANES	magyar fordítása nem használatos (X -ray A bsorption N ear E dge S tructure)
XRD	Röntgendiffrakció
ZnO	Cink-oxid



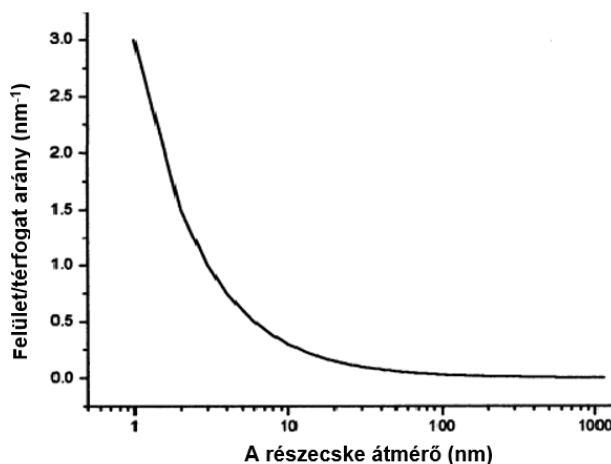
„Ha az Univerzum minden anyaga, a Nematodákat kivéve, eltűnne szem elől, világunk mégis homályosan felismerhető volna, és ha testetlen lelkeként szétnézhetnénk, megtalálnánk a hegyeket, dombokat, völgyeket, folyókat, tavakat és óceánokat a Nematodák egy vékonyka filmrétegén ábrázolva. A városok elhelyezkedése megfejthető lenne, minden egyes emberi lenyomatnak lenne megfelelője a fonálférgék lenyomatában. Fák, mint kísérteties evezők mutatnák utcáinkat és sugárútjainkat. A különféle növények és állatok területei megfejthetőek lennének, és elegendő tudással, sok esetben még a fajaik is meghatározhatóak lennének egy vizsgálattal az ő hajdani Nematoda parazitáikból.”

N. A. Cobb: Nematodes and their relationships (1915)

1. Bevezetés

A nanotechnológia jelentősége már az élet számos területén megkérdőjelezhetetlen (UNESCO, Science Report 2015). Ez a fogalom a nano (10^{-9}) mérettartományba tartozó, tehát legalább egy dimenziójukban 1-100 nm közé eső anyagok alkalmazására vonatkozik. A nanotechnológia célja elsősorban nem teljesen új anyagok vagy készítmények előállítása, hanem a méretből adódó kedvező tulajdonságok kihasználásával a készítmények hatékonyságának növelése. Erre számos példa található a számítástechnikában, gyógyászatban, kozmetikumok előállításakor. Ezen technológiával előállított készítmények már a fogyasztókhöz is eljutottak, gyártásuk az elkövetkező évtizedben rohamosan növekedni fog. Ebből adódóan környezetbe való kikerülésük megátolhatatlan, viszont hatásuk a környezetre és az élőlényekre még nagyrészt ismeretlen. Mivel a nanotechnológia az egyik leggyorsabban fejlődő terület, egyre inkább a környezettoxikológiai kutatások középpontjába kerül (Roh et al., 2010). Nanotechnológiával előállított anyagokat, például a nanorészecskéket, speciális tulajdonságaiknak köszönhetően számos termék gyártása során használják (Aitken et al., 2006). Ezeket a tulajdonságaikat jórészt a nagy felület/térfogat arányuknak (1. ábra) köszönhetik, emiatt az atomok nagyrésze a felszínhez közel helyezkedik el (Casals et al., 2012). A megnövekedett felület kihasználható például a környezetvédelemben, szennyvíztisztításban az ivóvíz hatékonyabb arzénmentesítésére.





1. ábra Felület/térfogat arány kapcsolata a részecske átmérővel (Lau és M. Piah (2011))

Amellett, hogy számos termék előállításánál használnak nanotechnológiát, a biológiai hozzáférhetőségük és az élő szervezetre gyakorolt lehetséges toxikus hatásuk jórészt ismeretlen (De Jong and Borm 2008). Nanorészecskék természetes úton is keletkezhetnek, például erdőtüzek, vulkánkitörések során. Emberi tevékenység útján keletkezhetnek tervezett formában, de nem kívánatos melléktermékként is, például belsőégésű (dízel) motorok működése során, illetve hegesztés, grillezés alkalmával. Cink-oxid (ZnO) nanorészecskék használatosak kerámiák, cement, üveg és számos egyéb termék gyártása során (Song et al., 2010). Hatékony UV fényabszorpciós kapacitásuk miatt ZnO nanorészecskéket használnak a fényvédő krémekben és egyéb kozmetikai termékekben is (Serpone et al., 2007), így a ZnO nanorészecskék megnövekedett mértékű kikerülése a környezetbe fokozott kockázatot jelenthet (Dumont et al., 2015). Számos tanulmány vizsgálta ZnO nanorészecskék, illetve nagyszemcsés megfelelőjük hatását vízi és talaj ökotoxikológiai teszteken keresztül (Blinova et al., 2010; Heinlaan et al., 2008). Nanoanyagok szabadon élő fonálférgekre gyakorolt hatásaival kapcsolatos adatok azonban lényegében kizárólag csak egyetlen tesztszervezetre, a Rhabdita rendbe tartozó, bakterivor (baktériumfogyasztó), r-stratégista *Caenorhabditis elegans* fajra vonatkozóan állnak rendelkezésünkre (Hägerbauer et al., 2015). Korábbi vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy a K-stratégista fonálférgek eltérő taxonómiai pozíciójukból, és ebből eredően egyes eltérő anatómiai tulajdonságaikból is következően valószínűleg sokkal érzékenyebben reagálnak a xenobiotikumokra, mint a Rhabditida rendbe tartozó fonálférgek (Johnson et al., 1974). Meyer et al. (2009) bizonyította, hogy a 2,4-diacetil-kloroglukinol antibiotikum eltérő hatást gyakorolt növényi nedvszívó *Xiphinema amaricanum* (Penetrantia: Dorylaimida) fajra, mint a vizsgált baktériumfogyasztó fajokra. A K-stratégista, növényi nedvszívó *Xiphinema vuittenezi* (Penetrantia: Dorylaimida) gazdasági szempontból az egyik legjelentősebb *Xiphinema* faj, mert gyümölcsfák és a szőlő kártevője (Evans et al., 1993), különösen Közép- és Kelet-Európában. Sok



gazdanövénye van (Luc et al., 1964; Andrásy és Farkas; 1988, Répási et al, 2006), illetve számos talajtípusban megtalálható. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy megfelelően használható tesztszervezet laboratóriumi körülmények között, akár mortalitási, akár nehézfém felvételi és leadási vizsgálatokban (Horváth et al., 2010; Sávolgy et al., 2015; Sávolgy et al., 2016). Terepen gyűjtött talajmintákból kinyert egyedei laboratóriumban hetekig életben tarthatók. Viszonylag nagy testméreteikből és egyedi biomasszájukból adódóan nehézfém felvételi viszonyaik és ezek hatásai az állatok elemtartalmára egyedi szinten is vizsgálhatók totálreflexiós röntgenfluoreszcencia (TXRF) spektrometriával.

A szabadon élő baktériumfogyasztó *Panagrellus redivivus* (Secernentia: Rhabditida) faj régóta használatos (Winkler and Pramer, 1961) különféle biológiai kutatásokban, mint modell szervezet (Srinivasan et al., 2013), illetve akváriumi kultúrákban, halivadékok táplálékként (Ricci et al., 2003). Ez az r-stratégista fonálféregfaj könnyen tartható laboratóriumi viszonyok között, emiatt használják vízi és talajban végzett toxicitási vizsgálatokban egyaránt (Samoiloff et al., 1980; Boyd and Williams, 2003; Leitgib et al., 2007). Nagyobb reprodukciós rátájuk miatt, illetve az ellenálló dauer lárvaformájuk miatt az r-stratégista fonálféreg kevésbé érzékenyen reagálnak a xenobiotikumokra (Bongers, 1990). Azonban kevés adat áll rendelkezésre ZnO hatásairól más életmenet-stratégiájú fonálféregre, például a K-stratégista *X. vuittenezi* fajra. Az eddigiekben már számos publikáció született nano-ZnO *Caenorhabditis elegans*-ra gyakorolt toxikus hatásáról (például: Gupta et al., 2015; Khare et al., 2011; Ma et al., 2011, Wang et al., 2009). Ezek a vizsgálatok jelentősen eltérő toxicitási adatokat szolgáltatottak, feltehetően a tesztközeg és a módszerek közötti különbségek miatt.



1.1 Célkitűzések

Doktori kutatásaim célja volt, hogy vizsgáljam a nagyszemcsés (bulk), illetve a nano-ZnO toxikus hatását különböző életmenet-stratégiájú szabadon élő fonálférgekre. A legtöbb eddigi eredmény nanorészecskék ökotoxikológiai hatására vonatkozóan kizárólag egyetlen r-stratégista baktériumfogyasztó fonálféregfajhoz, *Caenorhabditis elegans*-hoz köthető. Ezért a doktori kutatásom során célul tűztem ki két további szabadon élő fonálféreg faj érzékenységének vizsgálatát a cink mérgező hatásával szemben. Ezek egyike a *C. elegans*-hoz hasonló életmódú, korábban szintén elterjedt ökotoxikológiai tesztorganizetként használt *Panagrellus redivivus*, a másik pedig a növényi nedvszívó, táplálkozásmódja révén növényvédelmi jelentőséggel is bíró, K-stratégista életmenetű *Xiphinema vuittenezi* faj volt.

Kísérleteim három fő irányba összpontosultak:

i.) egy kereskedelmi forgalomban kapható nano cink-oxid vegyület toxikus hatásainak vizsgálata, annak nagyszemcsés megfelelőjével összehasonlítva. Miután az anyagok karakterizálása során azt tapasztaltuk, hogy a szemcseméret a nano-ZnO esetén sem a nano mérettartományba esik,

ii.) célzottan előállított nano- és nagyszemcsés ZnO toxikus hatásainak vizsgálatát is célul tűztem ki.

iii.) fenti eredmények alátámasztása, értelmezése céljából egyes elemek felvételi viszonyainak analitikai vizsgálata a két fonálféreg fajon.

Kísérleteim kereskedelmi forgalomban kapható nano szerkezetű cink-oxid (nano-ZnO) és nagyszemcsés cink-oxid (bulk-ZnO) okozta mortalitás vizsgálatára irányultak. Vizsgáltam továbbá a szemcseméretnek a cink felvételére és az állatok elemtartalmára gyakorolt hatásait a K-stratégista *Xiphinema vuittenezi* modellszervezet bevonásával.

Célom volt vizsgálni, hogy a mortalitást az oldott cinktartalom okozza-e, ennek érdekében ZnSO₄-tal is végeztem a mortalitás tesztet.

Elemfelvételi vizsgálatokat is végeztem. Dr. Sávoly Zoltán közös munkánk során meghatározta az állatok cinktartalmát nano- és bulk-ZnO kezeléseken. Annak érdekében, hogy megállapítsam, hogy szerves anyag jelenléte milyen hatást gyakorol a cink felvételre, illetve az állatok elemtartalmára, elemfelvételi vizsgálatokat folytattunk talajoldat jelenlétében is. Célom volt emellett annak megállapítása, hogy a felvett cink milyen gyorsasággal ürül az állatok szervezetéből, valamint, hogy van-e erre hatása a részecskeméretnek.

Toxicitási vizsgálatokat végeztem az r-stratégista bakterivor táplálkozásmódú *Panagrellus redivivus* fajjal is annak megállapítása érdekében, hogy van-e különbség a kétféle szerkezetű



anyag hatásai között, illetve, hogy a toxicitásért felelőssé tehető-e a cinkionok kioldódása a bakterivor táplálkozású faj esetén.

Vizsgáltam, hogy a különböző szemcseméretű cink-oxidok jelenlétében kialakult koncentráció-függő hatások megegyeznek-e. A két különböző életmenet-stratégiájú faj érzékenysége közti különbséget teszteltem mortalitásukon keresztül, vizsgálva, hogy van-e különbség a két faj érzékenysége között az LC_{50} értékek alapján.

Igyekeztem felderíteni a ZnO okozta toxicitás mellett, elemfelvételi méréseken keresztül, a két faj cinkfelvétel értékei közötti különbségeket.

Vizsgáltam továbbá, hogy fennállnak-e összefüggések az állatok elemtartalma és a ZnO kezelések dózisa között. A cink mellett az alábbi elemek koncentrációját is mértük az állatok testében: kalcium (Ca), réz (Cu), kálium (K), vas (Fe), cink (Zn), foszfor (P) és kén (S).



2 Irodalmi áttekintés

2.1 Fonálférgék

A fonálférgék (Nematoda) életmódjukat tekintve parazitákra és szabadon élők csoportjára osztható. Földünkön eddig mintegy 30.000 fajt írtak le (Andrássy-Farkas, 1988), de tényleges fajszámukat ennek többszörösére becsülik. Mind fajgazdagságát, mind egyedszámait tekintve rendkívül népes, illetve sokrétű törzs.

Bongers és Ferris (1999) meglepő, de becslésekkel igazolható kijelentése igen helytálló:

„Földünkön minden öt állatból négy a fonálférgék közé tartozik.”

Magyarországon hozzávetőlegesen 700 fajuk fordul elő (Andrássy, 1990). A szabadon élő fonálférgék a legnépesebb és legváltozatosabb csoportját képezik a talajfaunának. A természetes és az agrár-ökoszisztémákban szerepük egyaránt meghatározó.

A talajszemcsék közötti kapilláris vízhez kötöten élve a talaj táplálékhálózatában kulcsszerepet töltenek be, a mikrofauna tagjaiként befolyásolják a talajlakó lebontó szervezetek egyedszámát. Táplálkozási módok szerint növényi nedvszívóként, baktériumevőként, gombafonalakat szívgatóként, ragadozóként, illetve mindenevőként kategorizálhatók (Yeates et al., 1993). A fajok között r-stratégisták és K-stratégisták egyaránt előfordulnak, többségük pedig átmenetet képez a két életmenet-stratégia között. Az előbbire jellemző a rövid generációs idő, nagyszámú utódnemzedék, kedvezőtlen környezeti viszonyok, esetleges szennyezések jobb tűrése. Ebből adódóan a hirtelen fellépő, számukra kedvező környezeti változásokra, például tápanyag feldúsulásra gyorsan, egyedszámuk jelentős növekedésével reagálnak és különösen alkalmasak újonnan kialakuló élőhelyeken való megtelepedésre („colonizers”, sensu Bongers, 1990). Ezzel szemben a K-stratégistákra hosszú generációs idő, alacsony utódszám, nagyobb testméret és a szennyezésekkel szemben nagyobb érzékenység jellemző. Inkább stabil élőhelyi feltételek között érvényesülnek („persisters”, sensu Bongers, 1990). Könnyű laboratóriumi kezelhetőségük, magas faj- és egyedszámuk mellett változatos életmódjuk és jelentősen eltérő szaporodási dinamikájuk miatt kerültek a kutatások és a bioindikációs vizsgálatok középpontjába. Entomopatogén fonálférgék hatékonyan használatók kártevők ellen (Lacey és Georgis, 2012), és fontos szerepet töltenek be a biológiai növényvédelemben.

2.2 Fonálférgék szerepe ökotoxikológiai kutatásokban

Az ökotoxikológia kifejezést René Truhaut használta először. Úgy fogalmazott, hogy az ökotoxikológia a toxikológia azon ága, ami a természetes vagy mesterséges szennyezőanyagoknak az ökoszisztémákat alkotó állatokra (beleértve az embert is), növényekre, illetve mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatásaival foglalkozik integrált értelemben (Truhaut,



1977). Annak ellenére, hogy a fonálféreg ilyen nagy fajszámmal és változatos életmóddal jellemezhető, a legtöbb adat, illetve laboratóriumi kutatás egyetlen fajhoz köthető. A *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900), egy r-stratégista, efemer életmódot folytató körülbelül 1 mm hosszúságú szabadon élő faj. Táplálkozását tekintve bakterivor, zárt laboratóriumi kísérletekben *Escherichia coli* (Migula, 1895) baktérium képezi táplálékát. Honda (1924) közel egy évszázaddal ezelőtt végezte az első ökotoxikológia vizsgálatot szabadon élő fonálféreggel, melyben a tesztorganizmus *Caenorhabditis elegans* volt, korábbi nevén *Rhabditis elegans*. Az utóbbi több mint három évtizedben a fonálféreg elterjedt tesztorganizmus az ökotoxikológiai kísérletekben (Höss & Williams, 2009). A *Caenorhabditis elegans* tesztorganizmusként történő alkalmazást segíti, hogy elérhető például ISO szabvány is a teszt kivitelezéséhez (ISO 10872: ISO, 2010). A legegyszerűbben kivitelezhető és értékelhető tesztek azok melyek során végpontként a mortalitást, növekedésgátlást, szaporodásgátlást, vagy a fonálféreg mozgását használjuk. Ilyen jellegű vizsgálatokat már számos anyaggal végeztek, köztük fémekkel, mezőgazdasági, illetve háztartási vegyszerekkel, gyógyszerekkel.

Továbbá a fonálféreg alkalmasak a szennyező anyagok hatásainak molekuláris szintű vizsgálatára is. A *C. elegans* faj toxikogenomikai kutatásokban is használható, valamint microarray vizsgálatokban tesztorganizmusként használták egyes hormonmoduláris anyagok vizsgálata során (Novillo et al., 2005).

A szabadon élő fonálféreg laboratóriumi teszteken túlmutatva mikrokozmosz kísérletekben is megfelelő tesztorganizmusok. Ezek a tesztek már közelebb állnak a szabadföldi vizsgálatokhoz. Ilyen jellegű vizsgálatokban a fonálféreg közösségi szintű változását lehet elemezni egyes xenobiotikumok hatására. Talaj mikrokozmosz kísérletekben a talajt érő szennyező anyagokra fókuszálnak, például növényvédőszerre (Scholz-Starke et al., 2013; Höss et al., 2014.); fémekre (Van der Wurff et al., 2007). Fémekkel végzett mikrokozmosz kísérletek alapján elmondható, hogy a különböző fonálféreg taxonok különböző érzékenységet mutattak. A legérzékenyebb csoportoknak az *Acrobeles*, *Alaimus*, *Aporcelainellus*, *Clarkus*, *Plectus*, és *Thonus* genus-ok bizonyultak. A *Tylenchorhynchus*, Rhabditidae, Diplogasteridae kevésbé voltak érzékenyek (Hägerbäumer et al., 2015).

Mindezek mellett a *C. elegans* fajnak a szinte kizárólagos alkalmazása a laboratóriumi tesztekben azért nem tekinthető teljes értékű megoldásnak, mert számos laboratóriumi és terepi vizsgálat eredményei is azt mutatták, hogy a talajt ért szennyezésekre a szabadon élő fonálféreg eltérő érzékenységgel reagálnak (Sochová et al., 2006; Nagy, 2009). Zullini (1976) arra a megállapításra jutott, hogy a Dorylamida rendbe tartozó fonálféreg a legérzékenyebbek az ólomszennyezésre. Korthals et al. (1996) úgy találta, hogy a K-stratégista vegyes táplálkozású vagy ragadozó



fonálféreggek sokkal érzékenyebbek lehetnek a talajt ért nehézfém-szennyezésre, mint más táplálkozási csoportok tagjai. Nagy et al. (2004) több mikroelem hatását vizsgálta a fonálféreg közösségre egy terepi kísérletben, 5-10 év elteltével a kezelés után. Azt tapasztalta, hogy az egyszeri alkalommal kijuttatott kezelés ennyi idő elteltével már nem okozott kimutatható negatív hatást közösségi szinten a *Dorylaimida* rendbe tartozó fajoknál.

2.3 Cink-oxid

A cink egy alacsony olvadáspontú átmeneti fém, magyarul horganynak is nevezik. A rendszáma 30, a vegyjele Zn, relatív atomtömeg 65,38, olvadáspontja 420 °C, forráspontja 907 °C. Sűrűsége 7,14 g/cm³. Szobahőmérsékleten rideg, kékes színű.

A cink – ötvözetei révén – az egyike a leggyakrabban használt fémeknek. Ötvözetei közül a legrégebb óta használt anyag a sárgaréz, melynek színét cinktartalma határozza meg. Cinktárgyak már az ókorból ismeretesek, Európában a cinket a 14. századtól kezdték el iparilag előállítani.

A természetben öt izotópja van jelen, valamint 16 további izotópja előállítható. Ásvány formában nagy mennyiségben fordul elő. A legfontosabb cinkércásvány a szfalerit (ZnS), mely szennyezőanyagként például kadmiumot is tartalmazhat, emiatt kadmium kinyerésére is használják.

A cink az egyik leggyakrabban használt fém, korrózióálló tulajdonsága miatt használatos vas és acél bevonására. A cinkkel bevont vasat horganyzott vasnak is nevezik. A fehérbádoggal felületét is ón vagy cink bevonattal látják el.

A talaj cinktartalma azon ásványok mennyiségétől függ, amelyekben kísérő elemként szerepel a talajban, ezek többnyire könnyen málló ásványok. Jól adszorbeálódik ásványi és szerves kolloidokon is. Savanyú talajokban legnagyobb a cink mozgékonyasága, a meszes talajokban kevésbé mozgékony, emiatt a talajok túlzott meszesedése gátolhatja a cink felvételét és mozgását (Stefanovits, 1977). Kádár 2008-ban vizsgálta országosan a talajok Zn-ellátottságát, a vizsgált talajok 46%-a gyengén ellátottnak minősült, ez az arány Békés és Fejér megyében 85-87% volt.

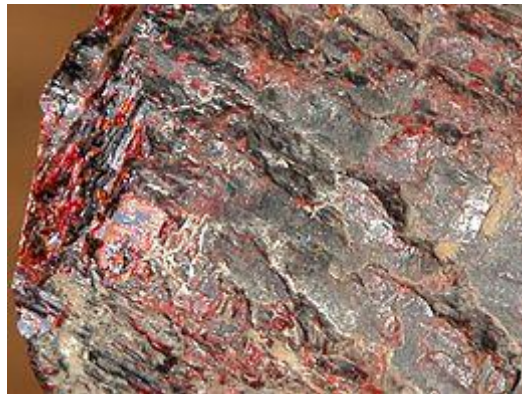
Magyarországi talajtípusokban a következőképpen alakul a talajok összes cinktartalma: csernozjomtalajokban 120-150 mg/kg; erdőtalajokban 70-115 mg/kg, míg homoktalajokban 30 mg/kg (Győri, 1984). A növények számára felvehető cink nagyjából a talaj felső 30 cm rétegében található (Kádár, 2002). A növényi cinktartalom kevésbé ad képet a talaj cink ellátottságának változásáról, mivel a növények cinktartalma kiegyensúlyozottabb. A közúti közlekedés is hozzájárul a cink szennyezettséghez, amely az utak mentén, útpadkán a legjelentősebb.

A 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet (http 1): cink esetében 200 mg/kg határértéket határoz meg. felszín alatti vizekre, pedig 200 µg/l.



A cink szerepe az állati és emberi szervezet igen sokrétű. Egyik legfontosabb enzimalkotó, valamint enzimaktivátor, szerepe van a sejtmembrán integritásának fenntartásában. A cink nyomelemként a szervezetben a metalloenzimek, a laktátdehidrogenáz, a karboxipeptidáz, valamint a DNS és RNS polimerázok központi alkotóeleme. Az emberi test körülbelül 1,5-2,5 g cinket tartalmaz, amely 60% -ban az izomzatban és 30% -ban a csontokban található. Felnőtt számára az ajánlott napi cinkbevitel 8-11 mg közé tehető. A cink hiánya a fejlődő szervezetekben a csontok gátolt fejlődése miatt törpenövést eredményezhet. A felnőtt szervezetben a cink hiánytünetei lehet a száraz, érdes bőr; vagy egyéb bőrproblémák; fehér foltok megjelenése a körmön (Sloup et al., 2017). Cink túlzott bevitele csökkenti a réz felszívódását. Ennek hátterében az állhat, hogy a cink antagonizálhatja a réz abszorpcióját azáltal, hogy indukálja a bél-thionein szintézisét. A táp cinktartalmának növekedésének hatására növekedett a thionein mennyisége a nyálkahártya sejtekben (Fischer et al., 1981).

A cink oxigénnel alkotott vegyülete a cink-oxid (ZnO), amely szobahőmérsékleten fehér por. A nagyszemcsés ZnO is finom eloszlású por. Természetben előforduló formája a hexagonális rácsszerkezetben kristályosodó cinkit. Színe a vas és mangán tartalmától vörös, narancssárgás lehet.



2. ábra Természetben előforduló cinkit (J.A. Davidson felvétele, forrás: <http> 2)

A cink-oxid a sárgarézt gyártásának mellékterméke, emiatt régóta ismert. A cink-oxid amfoter jellegű. Lúgokban történő oldásakor hidroxó-komplexek, savakban való oldásakor cink-sók képződnek.

Cink-oxid mesterségesen előállítható a cink levegőn való hevítésével, vagy valamilyen cink vegyület hevítésével is. A cink-oxid felhasználása igen sokféle a gumipartól kezdve egyes kozmetikumok alapanyagaként is alkalmazzák. Továbbá alkalmazzák cigaretta filterben, illetve élelmiszerek csomagolása során (Bergmann & Jung de Andrade, 2011). A cink-oxid mellett a cink szulfidot (ZnS) alkalmazzák lumineszkáló képernyőkön.



A nano-ZnO felhasználása hasonló annak nagyszemcsés megfelelőjéhez. Gumigyártás, kerámiák előállítása során használják, valamint festékek előállítására. A kozmetikai iparban nagyobb szerepet kap, főként testápolási termékek, illetve fényvédő krémek összetevőjeként. A titán-dioxidhoz (TiO₂) hasonlóan UV abszorpciós tulajdonsága révén számos naptejben, fényvédő krémekben megtalálható (Borm et. al., 2006). Valamint alkalmazható víztisztítás során a szerves szennyezők eltávolítására (Bergmann & Jung de Andrade, 2011).

2.4 Nanotechnológia

A nanotechnológia története Richard P. Feynman Nobel-díjas fizikus 1959-es beszédéig nyúlik vissza. Ekkor már egy olyan technológiáról beszélt, melynek segítségével akár egy tű hegyére is felírhatnánk egy enciklopédia tartalmát. Feynman által inspirálva 1986-ban megjelent Eric Drexler könyve, „Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology” címmel. Ugyanebben az időszakban a technika fejlődése is elősegítette a nanotechnológia útját, a Scanning Tunneling Microscope 1981, valamint az Atomic Force Microscope, 1986 megjelenésével A nanotechnológia igazi korszaka azonban a szén-nanocső tudományos leírásával kezdődött 1991-ben (Iijima, 1991). Ezután sorra jelentek meg nanotechnológiával előállított anyagok, termékek. A döntéshozók is felismerték, hogy pontos definíciókra van szükség a nanoanyagok meghatározására.

Az ISO 2008-ban a nanorészecskét olyan diszkrét részecskéként definiálta, melynek mérete mind a három dimenzióban kisebb, mint 100 nm (ISO/TS 27687:2008).

Az ECHA definíciója ([http 3](http://3)) szerint: „A nanoanyagok olyan vegyi anyagok vagy anyagok, amelyek esetében a részecskeméret legalább egy dimenzióban egy 1-100 nanométer (nm) tartományba esik.”

Az Európai Bizottság 2011-es ajánlása szerint ([http 4](http://4)) a nanoanyag fogalma az alábbiak szerint definiálható: „A „nanoanyag” olyan természetes anyag, nem szándékosan 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 részecskéknek a darabszám szerinti méreteloszlás alapján vett legalább 50%-a esetében az 1 nm-től 100 nm-ig terjedő mérettartományba esik.”

További konkrét esetekben, már 1% -ot meghaladó, de 50%-nál kisebb küszöbérték is alkalmazható, ha ezt környezetvédelmi, egészségügyi szempontok indokolják. Emellett külön említést tesz formájuk miatt a szén alapú anyagokról. Ez alapján nanoanyagnak minősíti a fulleréneket, grafénlapkákat és az egyrétegű szén nanocsöveket, melyek legalább egy dimenzióban kisebbek, mint 1 nm. Emellett a nanoanyag definiálása térfogategységre vetített fajlagos felület



alapján is meghatározható: ha egy anyag térfogategységre vetített fajlagos felülete $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ -nél nagyobb, akkor megfelel a nanoanyag definíciójának. Külön pontban kiemeli az alábbi fogalmak definícióját:

részecske: a környezettől fizikailag egyértelműen elhatárolható kisméretű anyagdarab

agglomerátum: egymáshoz gyengén kötött részecskék vagy aggregátumok olyan együttese, melynek felülete hasonló kiterjedésű, mint alkotó elemeinek felülete együttléve aggregátum: egymással összeköttetésben lévő részecskék.

A tervezetten előállított nanorészecskéket előállításának alapvetően két technológiai útja létezik:

i.) Nano méretnél nagyobb anyagokból kémiai és mechanikai úton (top-down), illetve ii.) kémiai reakciók révén atomokból (bottom-up).

A nanorészecskék kémiai szempontból számos anyag és vegyületcsoportba sorolhatók (Pándics, 2008):

Elemek:

- ◆ Félvezetők: kadmium, szilícium
- ◆ Vezetők: arany, ezüst, vas
- ◆ Nem fémek: szén (nanocsövek, fullerén)

Vegyületek:

- ◆ Szervetlen: fém-oxidok (alumínium-oxid (Al_2O_3), vas-oxid (Fe_2O_3), cink-oxid (ZnO), szilícium-dioxid (SiO_2), titán-dioxid (TiO_2))
- ◆ Szerves: polytetrafluoroetilén (PTFE), korom

Biológiai struktúrák: Liposzómák, micellák

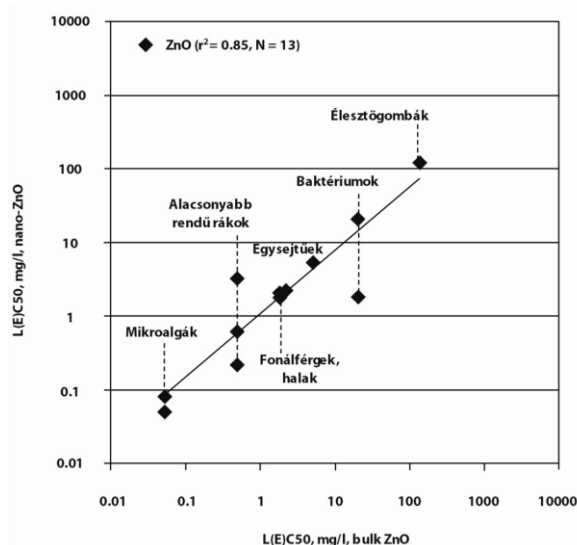
2.5 Nanoanyagok toxikus hatásai

A nanoanyagok ökotoxikológiai vizsgálatai során eddig elsősorban vízi szervezetekre koncentráltak (Hund-Rinke és Simon, 2006; Lovern et al., 2007; Fujiwara et al., 2008; Van Hoecke et al., 2008). A talajban élő szervezetekkel kapcsolatban sokkal kevesebb adat áll rendelkezésünkre. Az egyik leginkább vizsgált szempont, hogy milyen különbség van a nanoanyagok, illetve nagyszemcsés megfelelőjük hatása között.

Kahru és Dubourguier (2010) egy review cikkben azt elemezte, hogy a nanoanyagok ökotoxikológia hatásait vizsgáló publikációkban milyen csoportokat használnak tesztszervezetként. Úgy találták, hogy vizsgált adatoknak csak 3%-a származott fonálférgeket alkalmazott vizsgálatokból. Összegezték a nano- és bulk-ZnO-ra kapott L(E)C₅₀ (Lethal vagy Effective koncentráció) értékeket (3 ábra). Az ábra elkészítéséhez használt eredmények alapján a mikroalgák, fonálférgek és halak esetében nincs nagyágrendi eltérés a nano- és bulk-ZnO L(E)C₅₀



értéke között. A toxicitás fő okaként a Zn^{2+} ionok jelenlétét említik. Nagyságrendi eltérés az alacsonyabb rendű rákok, illetve a baktériumok esetében volt.



3. ábra Nano- és bulk-ZnO-ra kapott L(E)C50 koncentrációk különböző tesztszervezetek (Kahru és Dubourguier (2010))

A nano-ZnO ökotoxikus hatásai mögött különböző mechanizmusok állhatnak. A nano-ZnO toxikus hatása adódhat annak kémiai összetételéből, például a cinkionok kioldódásából, melyek citotoxikus hatása is bizonyított (Heinlaan et al., 2008). Ezen kívül azonban a nanorészecskék felülete, mérete, illetve alakja is oka lehet a toxicitásnak. Egy kísérletben összehasonlították 50 nm átmérőjű nano-TiO₂ hatásait a *Caenorhabditis elegans* fonálféreg fajra nagyszemcsés TiO₂ hatásaival. Vizsgálták a mortalitást, a kifejlett állatok hosszát és a peték számát az állatok testében. A nano-TiO₂ toxikusabbnak bizonyult, hatására kevesebb pete fejlődött az állatok testében, illetve a kezelt állatok testhossza is rövidebb volt (Wang et al., 2009). A ZnO nanorészecskék toxicitása a ZnCl₂ hatásával egyezett meg (Ma et al., 2009). Ma et al. (2011) később a ZnO nanorészecskék fototoxikus hatását hasonlították össze azok nagyszemcsés megfelelőjével *C. elegans*-ra. Ebben a kutatásban a nano mérettartományba tartozó részecske toxikusabbnak bizonyult. Vizsgálatok tárgyát képezte az is, hogy a nano mérettartományon belül milyen eltérések vannak. Roh et al. (2010) különböző méretű CeO₂ és TiO₂ hatásait vizsgálta *C. elegans*-ra. A kisebb átmérőjű részecskék (7 nm TiO₂ és 15 nm CeO₂) toxikusabbak voltak a fonálférgekre, mint a 20 nm TiO₂, illetve 45 nm CeO₂ átmérővel rendelkezők.

Egy kutatásban, Hu et al. (2010) vizsgálták TiO₂ és ZnO nanorészecskék hatását földigilisztára *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Ezen túlmenően a Ti és Zn bioakkumulációját, illetve a mitokondriumok károsodását is leírták. A közlemény megjelenését követően Van Gestel et al. (2010) néhány problémára hívta fel a figyelmet ezzel a kutatással kapcsolatban. Többek között kiemelték, hogy a nanorészecskék koncentrációja a talajban nem egyértelműen volt kifejezve. Kifogásolták továbbá, hogy a földigilisztákban mért koncentrációk sem voltak tisztán



értelmezhető. Továbbá a tesztek időtartalmát (7 nap) is túl rövidnek találták egy ilyen jellegű vizsgálathoz.

2.6 Totálreflexiós röntgenfluoreszcencia spektrometria

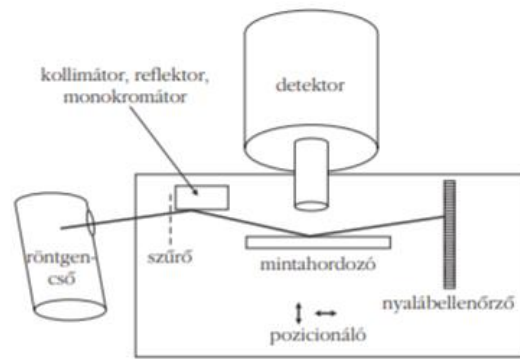
A totálreflexiós röntgenfluoreszcencia spektrometria (TXRF spektrometria) a röntgenfluoreszcencia jelenségén alapul. Ha egy adott mintát röntgensugárással sugárzunk be, akkor a mintából az elemösszetételének megfelelő, fluoreszcens röntgensugárzás lép ki, úgynevezett röntgenspektrum keletkezik, mely detektálható. Ha egy adott elemre jellemző energiájú röntgenvonal (vonalak) jelen van a spektrumban, ez az adott elem jelenlétére utal a mintában. A mintában jelenlévő elemek mennyiségét is meghatározható, mert az adott energiájú vonal intenzitása arányos az elem mintabeli koncentrációjával. Totálreflexiós geometria alkalmazása esetén a gerjesztő sugárzás teljes visszaverődést szenved a levegő/mintahordozó határfelületen, így a módszer érzékenysége jelentősen megnő, megfelelően vékony mintaréteget a hordozóra juttatva, gyakorlatilag mátrixzavarástól mentesen mérhető az elemek koncentrációja. Így a TXRF spektrometria felveszi a versenyt egyéb korszerű elemanalitikai módszerekkel. A 4. ábra mutatja be a TXRF spektrométer felépítését Sávolgy (2010) nyomán. A módszerről átfogóan ír Klockenkamper (1997), illetve magyar nyelven Osán et al. (2006). Alkalmazzák többek között humán sejtek és szövetek vizsgálatára. González (1999) vizsgálta különböző sejtvonalak elemtartalmát, többek között cinktartalmát, rézkezelést követően. A kezelés hatására leginkább a sejtek vas és kalcium tartalma emelkedett. Megállapította továbbá, hogy az intracelluláris Zn/Fe arány a metabolikus integritás markere lehet a különböző extracelluláris rézkoncentrációknak kitett sejtekben.

Parazita fonálférggekkel végzett vizsgálatok esetén is alkalmazzák ezt a módszert például metalloproteinek jellemzésére. Radoslavov et al. (2010) leírtak egy korábban ismeretlen metalloproteint a *Trichinella spiralis* endoparazita fonálféregben és TXRF segítségével meghatározták a metalloprotein vas, nikkell és cink arányát a fehérjéhez viszonyítva.

A TXRF parazita fonálférggek mellett a szabadonélő fonálférggekkel végzett vizsgálatokban is viszonylag gyakran alkalmazott analitikai módszer. Egy közelmúltban megjelent tanulmányban TXRF-el is mérték egy citosztatikus gyógyszer felvételét *C. elegans* által (Crone et al. 2015).

A szabadon élő fonálférggek közül a *Xiphinema vuittenezi* növényi táplálkozású fajjal, mely a jelen munka egyik tesztszervezete is, számos korábbi mérést végzett Dr. Sávolgy Zoltán, kutatócsoportunk munkatársa. A jelen munkát megelőző vizsgálatok során is elsősorban a TXRF eljárás szolgált a fonálférggek elemtartalmának meghatározására, rézzel vagy krómmal történt kezelést követően (Sávolgy et al., 2012).





4. ábra TXRF spektrométer felépítése (Sávoly Zoltán 2010)

3. Anyag és módszer

3.1 Tesztszervezetek

3.1.1 *Xiphinema vuittenezi*

X. vuittenezi rendszertani besorolása

Törzs: Nematoda

Osztály: Penetrantia

Rend: Dorylaimida

Család: Longidoridae

Alcsalád: Xiphineminae

Genus: *Xiphinema*

Faj: *Xiphinema vuittenezi* (Luc, Lima, Weischer and Flegg, 1964)

1. táblázat *X. vuittenezi* kifejlett nőstények morfometriai méretei (Andrássy-Farkas, 1988)

Teljes testhossz	2,8-3,7 mm
Testhossz / Testszélesség	52-72
Testhossz / Nyelőcső hossza	5,8-8,8
Testhossz / Farokhossz	80-120
Vulva távolsága fejtől/ Teljes testhossz (V%)	48-55%

Karcsú állat, nagy kehely vagy háromszög alakú oldalszervvel. A kifejlett nőstény állat hossza a 3,8 mm-t is elérheti (1. táblázat), emiatt a szabadon élő fonálféreg között igen nagytestű fajnak számít. Továbbá az 1. táblázat összefoglalja a fajra jellemző arányszámokat a testhosszhoz viszonyítva. A kutikula sima és az ajkak lekerekítettek. A 120-134 μm hosszúságú szájszurony fénymikroszkóppal jól látható, kilökő és visszahúzó izommal rendelkezik. A vulva körülbelül a test közepén nyílik, ez egy jellemző határozóbélyeg a fajnál. A farok alakja igen jellegzetes, félgömb alakban lekerekített, a végén pedig egy kis nyúlvány-szerű dudor (az úgynevezett „mucro”) található. A faj többnyire szűznemzéssel szaporodik, a hímek igen ritkák (Andrássy-Farkas, 1988), amit saját többéves megfigyeléseink is igazoltak, mivel ezres nagyságrendben vizsgáltunk meg ivarérett példányokat, és hímeket mindössze néhány alkalommal találtunk. Az elvégzett tesztekben kizárólag kifejlett nőstény állatokat használtam.



A faj fő elterjedési területe Európa, de előfordul az Egyesült Államokban és a Közel-Keleten is. Magyarországon a genus egyik leggyakoribb faja. Sok tápnövényű (polifág) faj, amely főként szőlőn és gyümölcsfákon él (Andrássy-Farkas, 1988). Több mezőgazdasági kultúrában is jelentős károkat okozhat, a tápnövények gyökérzete deformálódhat a szívogatás hatására (Jenser és Simon, 1980). Vírusvektor szerepe nem egyértelműen bizonyított (Flegg, 1969).



5. ábra Kifejlett *X. vuittenezi* nőstény, kiöltött szájszuronnal. B: Juvenilis korú *X. vuittenezi* elülső testvége. 60x nagyítás (Saját felvételek)

3.1.2 *Xiphinema vuittenezi* kinyerése a talajból

A kísérletekben felhasznált *X. vuittenezi* egyedek az összes elvégzett vizsgálathoz és kísérlethez azonos helyről kerültek begyűjtésre. A talajminták egy budapesti ingatlanon (N 47° 31' 58,8", E 18° 58' 30") található idős Germersdorfi cseresznyefa (*Prunus cerasus* L., cv. 'Germersdorf') gyökérzónájából, 20-40 cm mélységből kerültek begyűjtésre.

A két különböző időpontban gyűjtött talajmintából a Szent István Egyetem Talajtani és Agrokémiai Tanszékén számos talajtani szempontból fontos paraméter meghatározásra került. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat Talajminták tulajdonságai *X. vuittenezi* fonálféreg gyűjtési helyéről

pH(KCl)	pH(H ₂ O)	Só (%)	AL- P ₂ O ₅ (mg/kg)	AL- K ₂ O (mg/kg)	NH ₄ -N (mg/kg)	NO ₃ -N (mg/kg)	K _A
6,6	7,4	0,10	262	324	1,3	7,4	47
6,5	7,3	0,09	735	233	3,8	4,0	47

Annak érdekében, hogy a minták ne veszítsenek eredeti nedvességükből, kifuttatásukig lezárt műanyag zacskókban, hűtőszekrényben tároltam őket, 4 °C hőmérsékleten, legfeljebb a mintavételtől számítva egy hétig. Ez a tárolási körülmény tapasztalataink szerint nincs káros



hatással a fonálférgék életképességére. A fonálférgék kinyerése a talajból Cobb által leírt szitasorozatos módszer egy módosított változata alapján történt (Brown & Boag, 1988). Ennek során 200 g talajmintát csapvízzel átáztattam, ameddig szuszpenziót nem kaptam. Ezt követően 1 mm lyukátmérőjű rozsdamentes acél szitán átengedtem a szuszpenziót annak érdekében, hogy a nagyobb, darabos részeket (kövek, gyökér- és fadarabok) kiszűrjem. Ezt követően egy 180 µm lyukbőségű rozsdamentes acél szitán átöntöttem, a szitán fentmaradt réteget pedig egy tiszta tálba gyűjtöttem. A fennmaradt réteg átszitálását összesen háromszor megismételtem. Ebbe az összegyűjtött talaj szuszpenzióba kerültek a fonálférgék, illetve az egyéb talajállatok. A fonálférgék tényleges kifuttatása ezután kezdődött. Az előzőekben összegyűjtött talajt egy 45 µm lyukbőségű szitára helyeztem, a szitát pedig egy friss vízzel részlegesen feltöltött lapos műanyag tálba, oly módon, hogy a szita alja érintkezzen a tálban lévő víz felszínével, de érdemleges mennyiségű víz a szitába ne jusson be, tehát a víz szintje ne legyen a talajréteg felett. Ezt követően a mintákat 24 óráig sötétben, szobahőmérsékleten tartottam. Ez idő alatt a fonálférgék és egyéb talajállatok a szitán lévő talajból a vízbe vándoroltak. 24 óra elteltével az alátétekben lévő vizet üveg főzőpohárba öntöttem, majd hűtőben tároltam 4 °C hőmérsékleten. Ezt követően a *Xiphinema vuittenezi* egyedek kiválogatása sztereomikroszkóp (Olympus SZH 10, Olympus Optical CO., LTD., Tokyo, Japan) alatt történt műanyag tüvel. Az ivarérett *X. vuittenezi* nőtények kiválogatása az alábbi határozó bélyegek alapján történt: fej és fark morfológiája, vulvopozíció. A kísérlet megkezdéséig a kiválasztott *X. vuittenezi* nőtényeket desztillált vízben, üveg főzőpohárban tartottam, melyet parafilmmel zártam le.



6. ábra Jobbra kifejlett *X. vuittenezi* nőtény és balra juvenilis nőtény a futtatás után sztereomikroszkóp alatt (Saját felvétel)





7. ábra *X. vuittenezi* kifejlett nőstény, kiöltött szájszuronnal (200x nagyítás). A kép jobb szélén látható a tesztek során az állatok mozgatására használt műanyag eszköz vége (Sávoly Zoltán felvétele)

3.1.3 *Panagrellus redivivus*

Rendszertani besorolása

Törzs: Nematoda

Osztály: Secernentia

Rend: Rhabditida

Család: Panagrolaimidae

Genus: *Panagrellus*

Faj: *Panagrellus redivivus* (Linné, 1767)



8. ábra *P. redivivus* kifejlett nőstény, (60x nagyítás, saját felvétel)





9. ábra *P. redivivus* kifejlett nőstény farokvége, (600x nagyítás, saját felvétel)

Ezen r-stratégista, baktériumokkal táplálkozó faj egyedei leginkább erjedő anyagokban fordulnak elő nagy tömegben. Váltivarú állatok, a nőstények szexferomont termelnek. Ovovivipar állat, az első juvenil állapot már az anyák testén belül bekövetkezik. A második lárvastádiumtól a kifejlett állapot elérésig körülbelül 96 óra telik el. Három lárvastádiumon keresztül 250-350 μm -ről 750-2000 μm -re növekszenek. A petesejt csak a párzás előtt termelődik, míg a spermiumok termelődése már a negyedik vedlés végén megkezdődik (Hechler, 1970). A vedlés folyamata eltér a nőstények és a hímek esetén. A hímek levedlik a kutikulát, míg a nőstények esetén a kutikula feloldódik és felszívódik (Samoiloff & Pasternak, 1969).

A *Panagrellus redivivus* faj törzstenyészetét gabona alapú táptalajon tartják fent, 20 ± 1 °C hőmérsékletű termosztátban, a SzIE Állattani és Állatökológiai Tanszékén. Az ivarérett nőstények kiválogatása az előző fajhoz hasonló módon történt, Olympus SZH 10 (Olympus Optical CO., LTD., Tokyo, Japan) preparáló mikroszkóp alatt, egy műanyag tű segítségével. A kiválogatott kifejlett nőstényeket a kísérlet megkezdéséig a Xiphinémákhoz hasonló módon tartottam hűtőszekrényben.

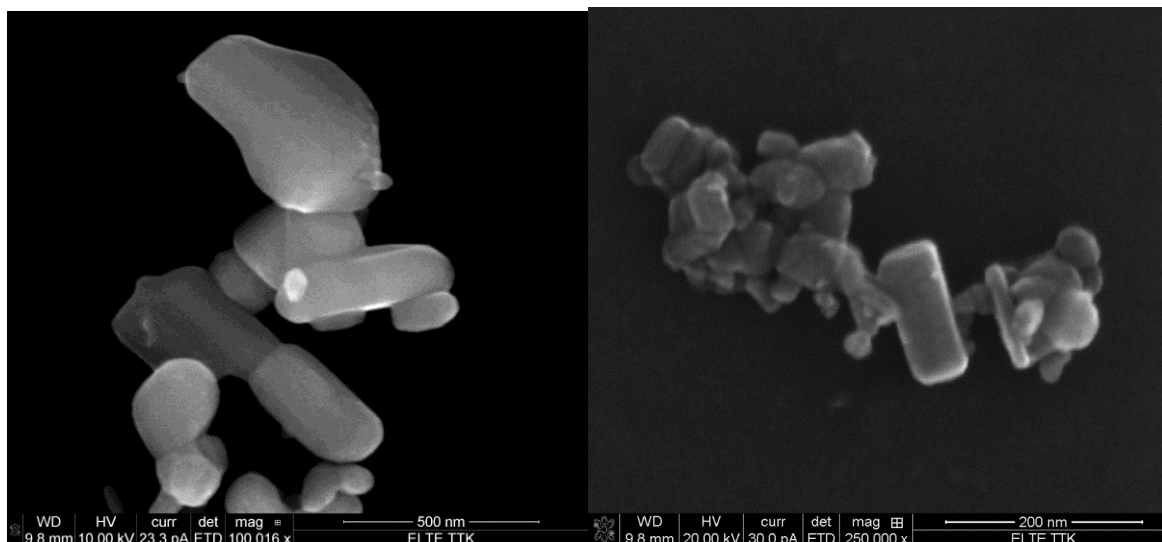


3.2 Kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett vizsgálatok

3.2.1 Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO

A kereskedelmi forgalomban kapható ZnO részecskéket (10. ábra) a Sigma-Aldrich állította elő. A nano-ZnO gyártó által hivatalosan megadott paraméterei a következők voltak: <50 nm (TEM); hivatalos átlagos részecskeméret: <100 nm (TEM); fajlagos felület: 15-25 m²/g.

A cinkionok hatásainak vizsgálatához ZnSO₄-ot (Merck Kft., Budapest, Magyarország) használtam.



10. ábra Nagyszemcsés (bulk)(A) és nanoszemcsés (nano)(B) ZnO (Sigma-Aldrich) (Sávoly Zoltán SEM felvételei)

Kutatócsoportunk analitikai kémikusa, Dr. Sávoly Zoltán különböző módszerekkel vizsgálta a ZnO részecskék méreteit. A két mérettartományba tartozó, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO részecskéket. EPMA módszer segítségével vizsgálva megállapította, hogy azok kristályszerkezete megegyezik, mindkét esetben cinkit módosulat alkotja. A nanorészecskék méreteit dinamikus fényszóródással is vizsgálta. Ez a vizsgálat azt mutatta, hogy a nano-ZnO esetén a részecskék a vizsgálat körülményei között jellemzően 150 nm és 400 nm közé eső hidrodinamikai átmérővel rendelkeztek. Ezt a mérést a nagyszemcsés cink-oxiddal nem sikerült elvégezni, mert ezt a részecskék mérete nem tette lehetővé. Az elvégzett mérések alapján jelentős aggregáció sem mutatkozott a mintákban, illetve STEM felvételek alapján valamilyen felületkezelő anyag jelenléte volt feltételezhető, amelyet az aggregáció elkerülése végett alkalmazhattak (Sávoly, 2013).

3.2.2 Toxicitási tesztek

A tesztek megkezdése előtt a nano- és bulk-ZnO részecskékből egyaránt szuszpenziót készítettem Milli-Q vízben, valamint a ZnSO₄ felhasználásával oldatot készítettem és 30 percig diszpergáltam ultrahangos fürdőben (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH &



Co. KG, Singen, Germany, 37 kHz, 560 W). A *Xiphinema vuittenezi* fajjal végzett toxicitási tesztek 24 lyukú poliészter mikrotitráló lemezen végeztem (IWAKI & CO., LTD., Tokyo, Japan). Minden lyukba 2 ml szuszpenzió, vagy a kontroll esetében Milli-Q víz került. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak a nano- és bulk-ZnO-t tartalmazó szuszpenziók esetén: 5, 25, valamint 50 mg Zn/l. A toxicitási tesztek során alkalmazott koncentrációk meghatározásánál figyelembe vettünk egyes, a munkacsoportunk által kapott korábbi eredményeket, illetve korábban mások által végzett vizsgálatok során alkalmazott koncentrációkat. További szempontként, igyekeztünk környezetileg releváns, valamint némileg magasabb értékeket is választani (Péntek & Fazekas, 2016). Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztunk. Minden koncentrációt négy ismétlésben állítottam be. A tesztek megkezdésekor 10-10 kifejlett nőstény *Xiphinema vuittenezi* egyedeket helyeztem be lyukanként a mikrotitráló lemez küvettáiba. A talajból kinyert, a teszt beállításáig desztillált vízben tartott nőstényeket véletlenszerűen választottam ki. Az állatok a 168 órás expozíciós idő alatt nem kaptak táplálékot. A mikrotitráló lemezek a kísérlet ideje alatt 20 ± 1 °C hőmérsékleten termosztátban (TS606-CZ/4-WAR; WTW. Weilheim, Germany), sötétben voltak elhelyezve. A toxicitási tesztek végpontja a mortalitás volt. 24, 96, 168 óra expozíciós idő leteltével az elpusztult fonálférgek számát alulról megvilágított látóterű preparáló mikroszkóp (Olympus SZH 10 Olympus Optical CO., LTD., Tokyo, Japan) alatt határoztam meg. A tartós mozgásképtelenséget a mortalitás jeleként értékeltem. Ennek ellenőrzésére egy műanyag tűvel óvatosan megérintettem az állatokat, lehetőleg a garatidegyűrű környékén, stimuláció céljából. Hogyha ezt követően sem tapasztaltam mozgást, vagy válaszreakciót, az adott példányt elpusztultnak tekintettem.

A kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal *P. redivivus* fajon végzett toxicitási tesztek kísérleti elrendezése néhány ponton eltért a fent leírt folyamathoz képest. A teszt során használt szuszpenziók, illetve a $ZnSO_4$ -ból készített oldat elkészítése megegyezett a fent leírt módszerrel. Ennél a kísérletnél alacsonyabb koncentrációkat választottam. A tesztek 96 lyukú poliészter mikrotitráló lemezen végeztem (IWAKI & CO., LTD., Tokyo, Japan). Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak $ZnSO_4$ esetén: 1,625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg/l. A bulk- és nano-ZnO esetén: 0,625; 1,25; 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg Zn/l. Az egyes lyukakba 400 μ l került, kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. Koncentrációként öt ismétlést állítottam be, ismétlésenként öt állattal. Azért döntöttem öt állat lyukankénti elhelyezése mellett, mert ennél több már zavarta volna a teszt értékelhetőségét.

Az expozíciós idő 24 óra volt, mely alatt az állatok nem kaptak táplálékot. A mikrotitráló lemezeket a kísérlet ideje alatt a fent említett módon termosztátban tartottam. A pusztulás *P. redivivus* esetében egyértelműen megállapítható volt, a tesztek leolvasásakor nem alkalmaztam



stimulációt. Az elpusztult egyedek igen jellegzetes egyenes, megnyúlt alakot vettek fel. Az elpusztult egyedek számát feljegyeztem.

3.2.3 Elemfelvételi vizsgálatok

Az elemfelvételi vizsgálatokhoz használt nano és bulk-ZnO szuszpenziók elkészítése a tesztek megkezdése előtt megegyezett a „3.2.2 *Toxicitási tesztek*” című részben leírtakkal. Az elemfelvételi vizsgálatok során az alábbi koncentrációkat alkalmaztam: 5, 50, 250 mg/l. Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. A vizsgálat kezdetén 24 lyukú mikrotitráló lemez küvettáiba került a ZnO-ot tartalmazó szuszpenzió, illetve a kontroll folyadék, majd 5-5 véletlenszerűen kiválasztott kifejlett nőstény egyed. Az ilyen módon összeállított tesztek 24 órán keresztül 20 ± 1 °C hőmérsékleten termosztátban (TS606-CZ/4-WAR, WTW. Weilheim, Germany), sötétben inkubáltam.

A makro- és mikroelemek koncentrációját a fonálférgék testében TXRF berendezés segítségével határoztuk meg. A Sávoly et al. (2012) által leírt módszer alapján a következő makroelemek mennyiségi meghatározását végeztük el: kalcium (Ca), kálium (K), foszfor (P) és kén (S); illetve az alábbi mikroelemek meghatározását végeztük el: cink (Zn), réz (Cu), vas (Fe). A 24 órás inkubációs idő elteltével megkezdtem az állatok testtömeg meghatározásához szükséges fényképek elkészítését. Az állatokat műanyag tű segítségével kiemeltam a kezelő közegből. Annak érdekében, hogy az esetlegesen kívülről a kutikulára tapadt ZnO részecskéket eltávolítsuk, egy percen keresztül tiszta Milli-Q vízben mostam át őket. Ez a lépés korábbi vizsgálataink alapján megfelelőnek bizonyult az állatok testére tapadt cinkszennyeződés eltávolítására (Sávoly et al., 2016). Ezt a folyamatot mind a kezelt, mind a kontroll állatokkal megismételtem.

Ezután egy üveg tárgylemezre egy csepp Milli-Q víz került, majd az átmosott fonálférgeket is belehelyeztem. Mivel a fonálférgék tömege a μg -os mérettartományban mozog, térfogatalapú becslés útján történt az állatok tömegének meghatározása, mely az alábbi képlettel írható le (Andrássy, 1956):

$$W = (L \cdot D^2) / (1,6 \cdot 10^6)$$

W: fonálféreg tömege (μg)

L: fonálféreg teljes testhossza (μm)

D: fonálféreg legnagyobb testátmérője (μm)

Fénykép készült az állatok teljes testéről, valamint a legnagyobb testátmérőről a vulvanyílásról (11. ábra, 12. ábra). A mérések elvégzéséhez az ImageJ szoftvert használtuk. Szeretném megjegyezni, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxid esetén elemfelvételi



vizsgálatokat csak a növényi táplálkozású, *X. vuittenezi* fajjal végeztem. A módszerleírás koherenciája végett, itt mutatom be a *P. redivivus* faj tömegbecsléshez használt képeit is.



11. ábra *X. vuittenezi* kifejlett nőtény teljes állat mikroszkóp alatt készült képe a tömegbecsléshez, illetve jobbra a legnagyobb testátmérő képe, a vulvanyílás (Saját felvételek)



12. ábra *P. redivivus* kifejlett nőtény teljes állat mikroszkóp alatt készült képe a tömegbecsléshez 18,8x nagyításban, illetve alul a legnagyobb testátmérő képe 52,5x nagyításban. (Saját felvételek)

A tömegbecsléshez készült felvételek elkészítése után a fonálférgeket egy műanyag tű segítségével kvarc mintahordozóra helyeztük. Egy mintahordozó lapra egy állat került, lehetőség szerint



középre. A lapok egyedi azonosító számmal rendelkeztek. Az állatok roncsolása 5 µl cc. suprapur HNO₃ (Merck KGaA, Németország) oldattal történt, mely 5 ng gallium (Merck KGaA, Németország) belső standardot tartalmazott. Ezt követően a mintákat tartalmazó kvarc mintahordozókat 90 °C-on 10 percig melegítettem üveg Petri-csészére helyezve. A mintaelőkészítést Dr. Sávoly Zoltán segítségével végeztem. Majd az így előkészített minták elemtartalmát ATOMIKA 8030CTXRF spektrométerrel (ATOMIKA Instruments GmbH, Németország) Dr. Sávoly Zoltán határozta meg a bécsi TU-Wien Atomintitut-ban. A mérések főbb paraméterei az alábbiak voltak: Mo K α gerjesztés (50 kV, 47 mA); Zr20 szűrő; 500 s mérési idő (live time).

Előfordult, hogy a szállítás során az állatok lecsúsztak az mintahordozókról, vagy valamilyen szennyeződés miatt a mérés nem adott értékelhető eredményt. Ilyen esetben ezen állatok eredménye nem szerepel a bemutatott eredmények között. De minden esetben minimum 3-5 állat méréseinek adataiból származnak a közölt eredmények.

3.2.4 Cinkleadás vizsgálata

Vizgáltam nagyszemcsés és nano-ZnO szuszpenziókkal kezelt *X. vuittenezi* nőstények cinkleadását is. Ennek során 50 mg/l szuszpenziót készítettem kereskedelmi forgalomban kapható nano, illetve nagyszemcsés ZnO-ból, a „3.2.2 Toxicitási tesztek” című fejeztben leírt módon. Az elkészült szuszpenziókba 20-20 darab kifejllett *X. vuittenezi* nőstényt helyeztem, az expozíciós idő 5 óra volt. Ezután az állatok áthelyeztem 250 µl Milli-Q vizet tartalmazó üveg főzőpohárba. Ettől kezdve a következő időpontokban: 1, 2, 3, 24, 48, 72, illetve 144 óra leteltével 20-20 µl vizet vettem ki a főzőpoharokból. A kivett mintákhoz 30 µl 2 mg/l koncentrációjú gallium belső standard-et adtunk, majd ebből a mintából 5-5 µl-t vettünk ki, és ezek cinktartalmát Dr. Sávoly Zoltán mérte TXRF módszerrel, minden esetben három párhuzamos ismétlésben.

3.2.5 Talajoldat készítése

Talajoldat jelenlétében vizgáltam a cink leadást és a cink felvételt. A talajoldat készítéséhez használt talajt azonos a helyről gyűjtöttem be, mint a fonálférgek kinyeréséhez gyűjtött talajmintákat. A talajoldat készítéséig a gyűjtött talajt hűtőszekrényben 4 °C hőmérsékleten tároltam. A talajoldat készítéséhez körülbelül 500-600 g talajt nedvesítettem be csapvízzel, ezt követően műanyag centrifuga csőbe helyeztem és centrifugálással kinyertem a talajoldatot. A centrifugálás 30 percen keresztül zajlott, 14.000 fordulat/perc fordulatszám, Janetzki T24 (Janetzki Tip, Lipcse, Németország) berendezésben. Több módszert alkalmaztunk a



talajoldat különböző tulajdonságainak vizsgálatára, mértük többek között a fajlagos vezetőképességét, a széntartalmát, a nitrogéntartalmát, illetve az elemtartalmát. A mérések adatai a 3. Táblázatban találhatók. A pH-értéket és a fajlagos vezetőképességet egy kombinált üvegelektroddal (Radelkis OP-211/1, Radelkis Kft., Budapest) felszerelt pH-mérővel és Radelkis OK-102/1 típusú vezetőképesség-mérővel határoztuk meg. A teljes széntartalmat, a teljes szerves széntartalmat és a teljes nitrogéntartalmat Multi N / C Jena 2100 (Analytik Jena, Németország) műszerrel határoztuk meg, három, 0,5 ml térfogatú mintát mérve. A makro- és mikroelemtartalmat TXRF spektrométerrel vizsgáltuk. Ebben az esetben az 5 ng Ga (Merck KGaA, Németország) belső standardot tartalmazó minták térfogata 5 µl volt, három mintát mértünk meg ugyanazokkal a paraméterekkel. Mivel a talajoldatot csapvízzel állítottuk elő, az üres koncentrációkat a víz, a nitrogén és elemtartalom mérésével határoztuk meg. A talajoldatban mért értékeket a 3. táblázat foglalja össze. A talajoldatot a *X. vuittenezi* nőstények elemtartalmának vizsgálata során, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-val való kezelés során használtuk fel.

3. táblázat *Xiphinema vuittenezi* gyűjtési helyéről származó talajoldat fajlagos vezetőképessége, kémhatása és az elemek koncentrációja

Fajlagos vezetőképesség	700 µS/cm
pH	7,50
Széntartalom	55,8±0,7 mg/l
Teljes szerves széntartalom	17,9±0,6 mg/l
Nitrogéntartalom	19,5±0,2 mg/l
<i>Elemek koncentrációja</i>	
Foszfor	3,91±1,56 mg/l
Kén	6,04±0,41 mg/l
Kálium	8,23±0,70 mg/l
Kalcium	203,5±3,9 mg/l
Mangán	2,70±0,03 mg/l
Vas	930,4±371,5 µg/l
Réz	14,23±2,12 µg/l
Cink	13,43±0,99 µg/l



3.3 Célzottan előállított cink-oxiddal végzett vizsgálatok

3.3.1 ZnO előállítási és karakterizálási folyamata

A ZnO részecskéket a Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai tanszékén állították elő az alábbi módon (dr. Kukovecz Ákos közlése alapján): mindkét méretű ZnO esetén 8,78 g $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -ot oldottak fel 50 ml ionmentes vízben, valamint 0,04 g NaOH-ot oldottak fel szintén 50 ml ionmentes vízben. A NaOH-oldatot állandó keverés mellett cseppenként adták hozzá a $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ tartalmazó oldathoz ($[\text{Zn}^{2+}] = 0,40 \text{ mol/l}$, $[\text{OH}^-] = 0,01 \text{ mol/l}$). A két oldat összekeverése a nagyszemcsés ZnO esetén hexametilén-tetramin (HMTA) jelenlétében történt, a nagyobb részecskeméret elérése érdekében. Mindkét esetben, tehát a nano és nagyszemcsés ZnO előállítása során egyaránt, azonnal fehér csapadék ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) keletkezett. Tízpercnyi további keverés után a $\text{Zn}(\text{OH})_2$ szuszpenziók teflon borítású autoklávba kerültek. A nano-ZnO előállításához 8 órán keresztül $180 \text{ }^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten tartották a szuszpenziót. A nagyszemcsés ZnO előállításához 10 órán keresztül $200 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartották a szuszpenziót. A folyamat hidrotermális részének maximális ideje 10 óra lehet, mivel ennél hosszabb idő elnyúlt, rúdszerű részecskéket eredményezne (Wang, 2004). A hidrotermális szintézis után a mintákat centrifugálták 8000 rpm fordulaton, 30 percen keresztül, majd $120 \text{ }^\circ\text{C}$ -on szárították azokat 12 órán keresztül. A ZnO részecskék előállítása során nem történt felületkezelés, a szárítás után megtörtént a minták jellemzése, amely transzmissziós elektromikroszkóppal és röntgendiffrakciós mintázatokat rögzítésével történt. A transzmissziós elektromikroszkóppal (FEI Tecnai G2 20 X-TWIN HR-TEM; FEI Company, Amerikai Egyesült Államok) készült felvételeken a pontfelbontás $0,26 \text{ nm}$ volt. A ZnO-minták etanolos hígított szuszpenziói cseppenként kerültek szárításra lyukasztott szénbevonatú réz TEM rácsokon. Legalább öt TEM mikrográf kép került rögzítésre minden minta esetén. A méreteloszlást az ImageJ szoftverrel végzett TEM képelemzés alapján nyertük. A röntgendiffrakciós mintázatokat Rigaku Miniflex II diffraktométer (Rigaku, Tokió, Japán) használatával rögzítettük $\text{CuK}\alpha$ sugárzással ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) 5 és 80° között (2θ) annak érdekében, hogy a kristályszerkezetről információt nyerjünk. A primer kristály méret (D) a Scherrer egyenlet segítségével került meghatározásra,

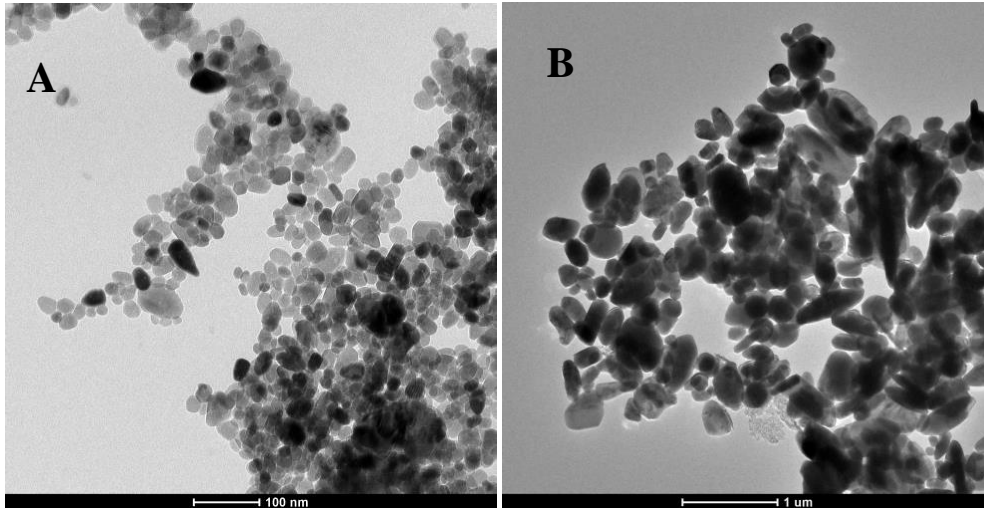
$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

ahol a K a Scherrer-egyenlet, λ diffrakcióhoz használt fény hullámhossza, β az éles csúcsok félértékszélessége, θ beesési szög (Vinila et al., 2014).



3.3.2 Célzottan előállított ZnO részecskék jellemzői

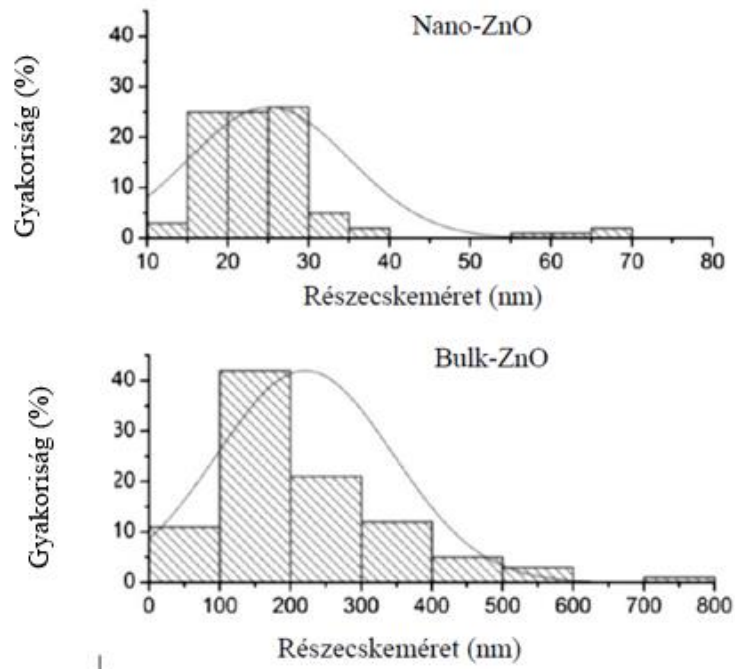
A hidrotermálisan előállított anyagok átlagos részecskéinek méreteit minden előállítás után meghatározták TEM segítségével a „3.3.1 ZnO előállítási és karakterizálási folyamata” című fejezetben leírtak szerint. A 13. ábra bemutatja a TEM-mel készült felvételek. Az „A” jelű képen nano-ZnO, illetve a „B” jelű képen a bulk-ZnO látható (más-más nagyításban).



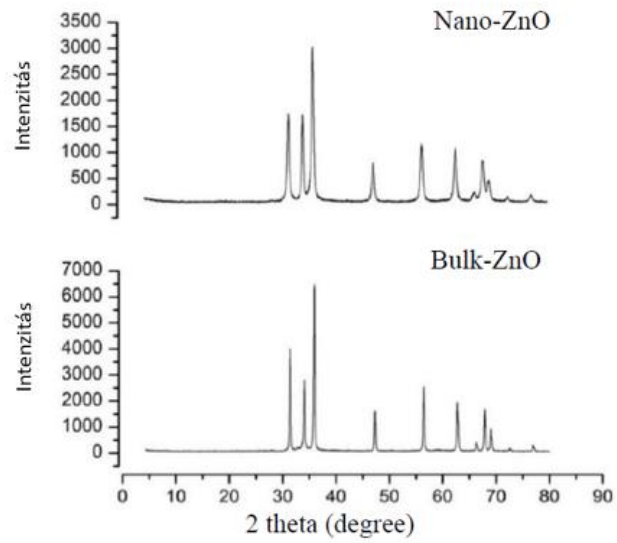
13. ábra Célzottan előállított nano-ZnO (A) és bulk-ZnO (B) TEM képe
(Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék)

A nanorészecskék és bulk részecskék részecskeméret-megoszlást a 14. ábra mutatja be. A mért szemcseméret (\pm SD) $25,1 \pm 9,92$ nm volt a nano részecskék esetében és $221 \pm 124,25$ nm a bulk-ZnO esetében. A 15. ábra bemutatja a ZnO nanorészecskék röntgendiffraktogram mintázatait. A következő kilenc diffrakciós csúcs a hexagonális wurtzit ZnO anyagoknak felel meg, és indexelhető a következő kristálysíkokra: (100) — $31,84^\circ$, (002) — $34,50^\circ$, (101) — $36,36^\circ$, (102) — $47,66^\circ$, (110) — $56,66^\circ$, (103) — $62,94^\circ$, (200) — $66,44^\circ$, (112) — $68,02^\circ$ and (201) — $69,20^\circ$. A kapott primer kristályméretek a következők: 20,06 nm (nano-ZnO) és 46,21 nm (bulk-ZnO).





14. ábra Nano-ZnO és bulk-ZnO részecskék részecskeméret-eloszlása TEM-mel meghatározva



15. ábra Nano-ZnO és bulk ZnO röntgendiffraktogramok



3.3.3 Toxicitási tesztek

A tesztek megkezdése előtt a nano-és bulk-ZnO részecskékből szuszpenziót készítettem Milli-Q vízben és 30 percig diszpergáltam ultrahangos fürdőben (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany, 37 kHz, 560 W). A toxicitási tesztek 24 lyukú poliészter mikrotitráló lemezen (IWAKI & CO., LTD., Tokyo, Japan) végeztem. Minden lyukba 3 ml szuszpenzió került, a tesztekben alkalmazott koncentrációk a következők voltak mindkét típusú szuszpenzió esetén: 0,8; 1,75; 2,5; 5; 10; 25; és 50 mg Zn/l. Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. Minden koncentráció esetén három ismétlést végeztem. A tesztek megkezdésekor 10-10 kifejlett nőstény *Xiphinema vuittenezi*, illetve *Panagrellus redivivus* egyed került behelyezésre a mikrotitráló lemez küvetáiba. Az állatok a korábban leírtak szerint a 24 órás expozíciós idő alatt nem kaptak táplálékot, illetve a mikrotitráló lemezek a kísérlet ideje alatt 20 ± 1 °C hőmérsékleten termosztátban (TS606-CZ/4-WAR; WTW. Weilheim, Germany), sötétben voltak elhelyezve. A toxicitási tesztek végpontja a mortalitás volt, amit 24 órás expozíciós idő leteltével ellenőriztem, fentebb a „3.2.2 Toxicitási tesztek” című fejezetben leírtak szerint.

3.3.4 Elemfelvételi vizsgálatok

A nano- és bulk-ZnO szuszpenziók elkészítése a tesztek megkezdése előtt megegyezett a „3.3.2 Toxicitási tesztek” című részben leírtakkal. Az elemfelvételi vizsgálatok során alkalmazott koncentrációkat a Szegedi Tudományegyetem által előállított cink-oxiddal végzett toxicitási tesztek eredményei alapján határoztam meg. Az elemfelvételi vizsgálatok során három koncentrációban vizsgáltam, hogy milyen hatással van a fonálféreg elemtartalmára a ZnO-expozíció. A kisebb koncentrációnak egy, a toxicitási tesztek során megállapított LC_{50} -nél kisebb koncentrációt választottam, a középső koncentráció az LC_{50} -hez közeli, illetve a legnagyobb koncentrációnak az LC_{50} -nél nagyobb koncentrációt alkalmaztam. A Szegedi Tudományegyetemen előállított ZnO-dal végzett elemfelvételi vizsgálatok során az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: 1, 5 és 25 mg/l Zn. Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. 24 lyukú mikrotitráló lemezbe került a ZnO-ot tartalmazó szuszpenzió, illetve a kontroll, majd 5 véletlenszerűen kiválasztott kifejlett nőstény *X. vuittenezi* vagy *P. redivivus* egyed. Az ilyen módon összeállított tesztek 24 órán keresztül 20 ± 1 °C hőmérsékleten termosztátban (TS606-CZ/4-WAR; WTW. Weilheim, Germany), sötétben inkubáltam, a toxicitási tesztekkel megegyező módon.

A makro- és mikroelemek elemtartalmának meghatározása a fonálféregek testében TXRF módszerrel történt a „3.2.3 Elemfelvételi vizsgálatok” alapján. A következő elemek mennyiségi



meghatározását végeztük el: kalcium (Ca), réz (Cu), kálium (K), vas (Fe), cink (Zn), foszfor (P) és kén (S).

A 24 órás inkubációs idő elteltével megkezdtem az állatok testtömeg meghatározásához szükséges fényképek elkészítését. Az állatok testtömegbecslése, a minták előkészítése, valamint a mérés a „3.2.3 Elemfelvételi vizsgálatok” című fejezetben leírt módszer alapján zajlott.

3.4 Eredmények értékelése

ToxRat statisztikai szoftver alkalmazásával (ToxRat Professional, 2010), 95% Probit analízissel történt az LC_{10} és LC_{50} értékek meghatározása. A mortalitást és az elemfelvételi vizsgálatok eredményeit R szoftver csomaggal (R Core Team, 2013) értékeltem ki. Kétutas ANOVA-t alkalmaztunk a mortalitási vizsgálatok kiértékelése során, függő változóként a mortalitást, faktorként a szemcseméretet (nano, bulk), illetve a koncentrációt állítottam be. Dunnett post hoc tesztet alkalmaztam a kezelt és kontroll csoport közti szignifikáns eltérés megállapítására, $p < 0,05$ szignifikancia szinten. Többutas ANOVA-t alkalmaztam, melyben a szemcseméret, koncentráció, és a faj, mint magyarázó változó, valamint Ca, Cu, K, Fe, Zn, P és S elemtartalom az állatok testében, mint függő változó szerepelt. Post hoc tesztként Tukey tesztet használtam.

A cinkleadási vizsgálatok kiértékeléséhez kétmintás t-próbát alkalmaztam, SPSS 19 verziójú statisztikai szoftverrel végeztem az elemzést.



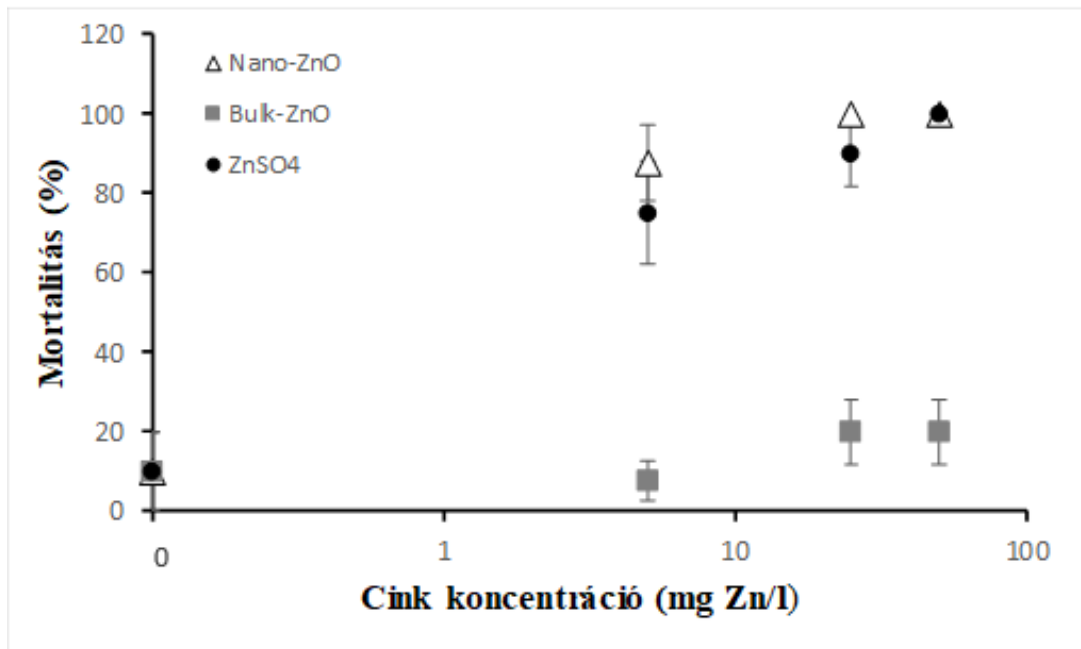
4. Eredmények

4.1 Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO hatásai

Toxicitási tesztekben vizsgáltam a kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxid hatásait a két különböző táplálkozású csoportba tartozó fonálféreg fajra. Vizsgáltam továbbá a cinkleadást és a talajoldat jelenlétében a cinkfelvételt. A toxicitási tesztek a két fajjal nem egy időben kerültek elvégzésre.

4.1.1 Toxicitási tesztek eredményei, *Xiphinema vuittenezi*

Vizsgáltam a kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk-ZnO hatásait a *X. vuittenezi* mortalitására. A tesztek 24 órás leolvasás eredményeit logaritmikus skálán ábrázoltam, a hibasávok a szórások értékét mutatják. A nano-ZnO hatására a vizsgált tartományban koncentráció-függő mortalitás volt tapasztalható (16. ábra). A nano-ZnO és ZnSO₄ kezeléseknél hasonló volt a mortalitásra gyakorolt hatása. Ezzel szemben a bulk-ZnO kevésbé volt toxikus, a 24 órás expozíció után a mortalitás csupán 20%-os volt a legnagyobb (50 mg Zn/l) alkalmazott koncentráció esetén. A bulk-ZnO mortalitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát folytattam 96, illetve, 168 órás expozícióig (4. táblázat). 96 óra expozíciós idő elteltével már a vizsgált legkisebb koncentráció (5 mg/l Zn) is 83% mortalitást eredményezett, 168 óra elteltével pedig minden vizsgált koncentráció esetén 100% volt a mortalitás. A kontrollban, amely Milli-Q víz volt, mind 96, mind 168 óra után is mindössze 20% volt a mortalitás mértéke.



16. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk-ZnO hatása *Xiphinema vuittenezi* mortalitására 24 órás expozíciós idő után



4. táblázat Kereskedelmi forgalomban kapható bulk-ZnO hatása *Xiphinema vuittenezi* mortalitására 96 és 168 órás expozíciós idő után

Vizsgálati anyag	Koncentráció (mg/l)	Expozíciós idő (h)	Mortalitás (%±szórás)
Kontroll	0	96	20±14,1
	5	96	83±9,6
Bulk ZnO	25	96	98±5,0
	50	96	100±0
Kontroll	0	168	20±14,1
	5	168	100±0
Bulk ZnO	25	168	100±0
	50	168	100±0

4.1.2 Elemfelvételi vizsgálatok eredményei talajoldat jelenlétében, *Xiphinema vuittenezi*

Az állatok cinktartalma három koncentrációban, 5, 50, 250 mg Zn/l alkalmazásával került vizsgálatra 24 órás expozíciós idő után talajoldat jelenlétében (5. táblázat). Kontrollként a kezeletlen fonálférgek Milli-Q vízben mért cinktartalmát tüntettem fel. A cinktartalom átlaga (±szórás) ng/testtömeg µg-ban kifejezve. A növekvő koncentráció növekvő cinktartalmat eredményezett az állatokban. 250 mg/l Zn-koncentráció esetén a kereskedelmi forgalomban kapható nano-ZnO-val történő kezelés nagyobb cinktartalmat eredményezett a kezelt állatokban, mint a bulk-ZnO. A 6. táblázatban összefoglalom az állatok elemtartalmát cink kezelést követően talajoldat jelenlétében. Elemtartalom átlaga (±szórás) ng/testtömeg µg -ban kifejezve.

5. táblázat *X. vuittenezi* nőstény fonálférgek testének cinktartalma 24 órás expozíciós idő után, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-ot tartalmazó talajoldatban

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>
Kontroll	0 mg/l	0,26 (±0,07)
	5 mg/l	0,49 (±0,029)
Nano-ZnO	50 mg/l	0,70 (±0,218)
	250 mg/l	0,88 (±0,111)*
Bulk-ZnO	5 mg/l	0,33 (±0,027)
	50 mg/l	0,67 (±0,006)
	250 mg/l	0,54 (±0,092)

ANOVA, post hoc Dunnett * = p < 0,05



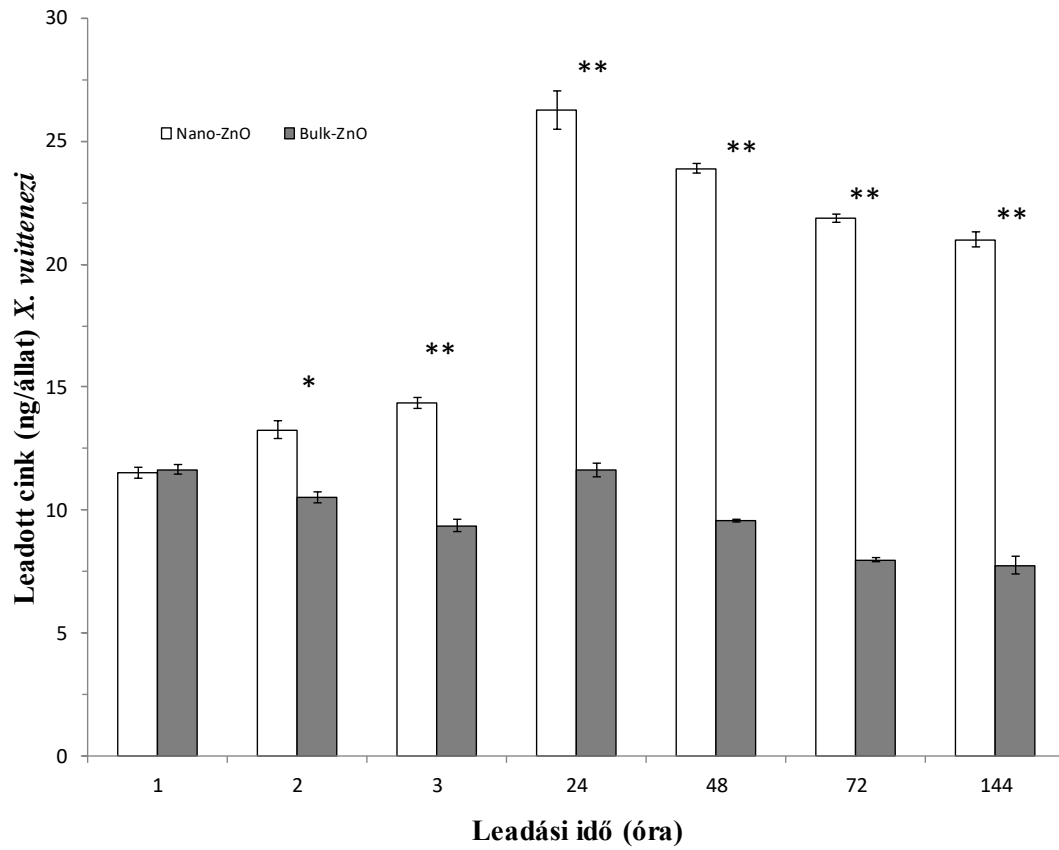
6. táblázat *X. vuittenezi* nőstény fonálférges testének elemtartalma 24 órás expozíciós idő után, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-ot tartalmazó talajolajlatban

	Ca	Cu	Fe	K	P	S
Nano-ZnO	1,80	0,07	0,31	0,90	3,93	2,29
5 mg/l	(±0,66)	(±0,01)	(±0,30)	(±0,35)	(±0,58)	(±0,46)
Nano-ZnO	1,57	0,11	0,41	0,64	5,42	2,35
50 mg/l	(±0,23)	(±0,01)	(±0,25)	(±0,40)	(±0,53)	(±0,34)
Nano-ZnO	1,65	0,06	0,22	1,13	4,68	3,11
250 mg/l	(±0,65)	(±0,02)	(±0,12)	(±0,26)	(±0,93)	(±0,76)
Bulk-ZnO	0,79	0,05	0,13	1,51	4,55	2,56
5 mg/l	(±0,19)	(±0,01)	(±0,04)	(±0,28)	(±0,44)	(±0,53)
Bulk-ZnO	1,72	0,07	0,10	1,03	4,72	2,99
50 mg/l	(±0,41)	(±0,02)	(±0,04)	(±0,45)	(±0,67)	(±0,52)
Bulk-ZnO	1,45	0,06	0,24	1,18	3,79	2,14
250 mg/l	(±0,33)	(±0,01)	(±0,13)	(±0,49)	(±0,69)	(±0,40)

4.1.3 Cinkleadás vizsgálatának eredményei

TXRF módszerrel vizsgáltam 50 mg/l-es koncentrációjú szuszpenziókkal kezelt *X. vuittenezi* kifejlett nőstény állatok cinkleadását, különböző időpontokban mérve az állatok által a Milli-Q vizes közegbe leadott cink mennyiségét (17. ábra). Ebben a vizsgálatban a Milli-Q vízben mérhető teljes cink tartalom meghatározásra került, az ábrán szereplő értékek egy állatra vonatkoznak. Szignifikáns különbséget a nano-és a nagyszemcsés ZnO-kezelések között vizsgáltam. A szignifikancia szint jelölései a következőképpen értelmezendők: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Az eltérő szemcseméretű ZnO vegyületekkel kezelt állatok cinkleadása között már 2 óra elteltével szignifikáns különbség mutatkozott a minták cinktartalma alapján. A különbség az első (1 órás) időpont kivételével minden mintavételi időpontban szignifikáns volt a nano- és nagyszemcsés anyaggal kezelt állatok cinkleadása között. A legtöbb cink 24 óra múlva volt mérhető, átlagban ekkor a Milli-Q vízből visszamért cink mennyisége a nano-ZnO kezelésben 26,3 (±0,78) ng Zn/állat volt, míg a nagyszemcsés ZnO kezelésben részesült példányok esetén 11,6 (±0,3) ng Zn/állat volt.

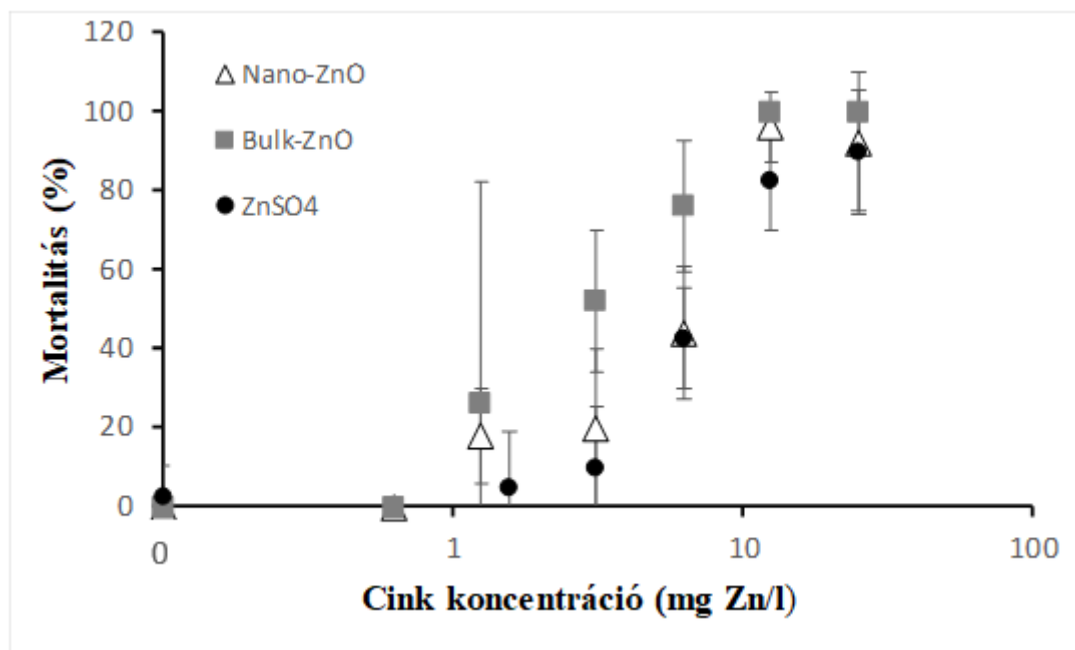




17. ábra *X. vuittenezi* által leadott cink mennyiségek Milli-Q vízben, 50 mg/l koncentrációjú ZnO szuszpenzióval kezelt állatok esetén.

4.1.4 Toxicitási tesztek eredményeim, *Panagrellus redivivus*

A toxicitási tesztek 24 órás leolvasás eredményeit logaritmikus skálán ábrázoltam, a hibasávok a szórások értékét mutatják. A kontrollban nem tapasztaltam mortalitást. A legalacsonyabb alkalmazott koncentráció esetén szintén nem volt mortalitás tapasztalható (18. ábra).



18. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO szuszpenziók, illetve ZnSO₄ hatásai *P. redivivus* mortalitására 24 órás expozíció esetén

A nano-ZnO esetében az 1,25 mg Zn/l volt az első koncentráció, ahol szignifikáns ($p < 0,05$) mortalitás-növekedést regisztráltunk a kontrollhoz képest, a bulk-ZnO esetén ez 0,625 mg Zn/l, illetve a ZnSO₄ esetén ez 6,25 mg Zn/l volt.

ToxRat statisztikai programmal meghatározott LC₁₀ és LC₅₀ értékek 95% konfidencia intervallummal szerepelnek a táblázatban (7. táblázat). A kereskedelmi forgalomban kapható nano-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 5,48 mg Zn/l volt. A bulk-ZnO nagyobb toxikus hatást mutatott a vizsgált koncentrációkban. A bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 1,45 mg Zn/l volt. A ZnSO₄ 24 órás LC₅₀ értéke 7,24 mg/l volt.

7. táblázat Nano-ZnO és bulk-ZnO LC₁₀ és LC₅₀ értékei (mg/l) *P. redivivus* 24 órás expozíciót követően

	LC ₁₀	LC ₅₀
Nano-ZnO	1,68 (0,35; 3,04)	5,48 (3,02; 9,91)
Bulk ZnO	N.d*	1,45 (0,27; 3,08)
ZnSO ₄	2,52 (1,76; 3,24)	7,24 (6,03; 8,71)

*N.d=nem meghatározható

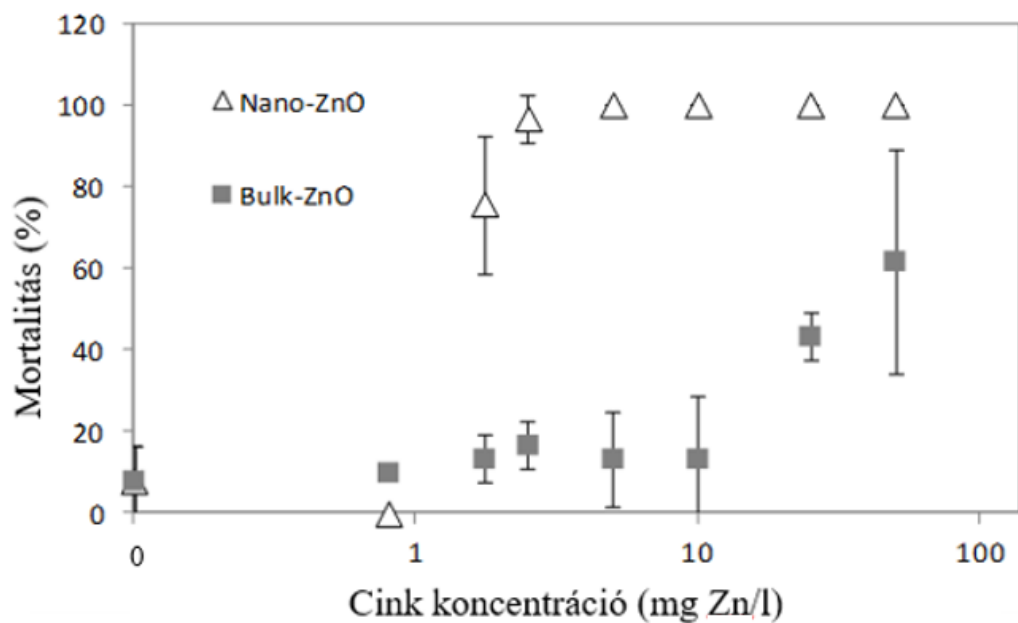


4.2 Célzottan előállított ZnO hatásai

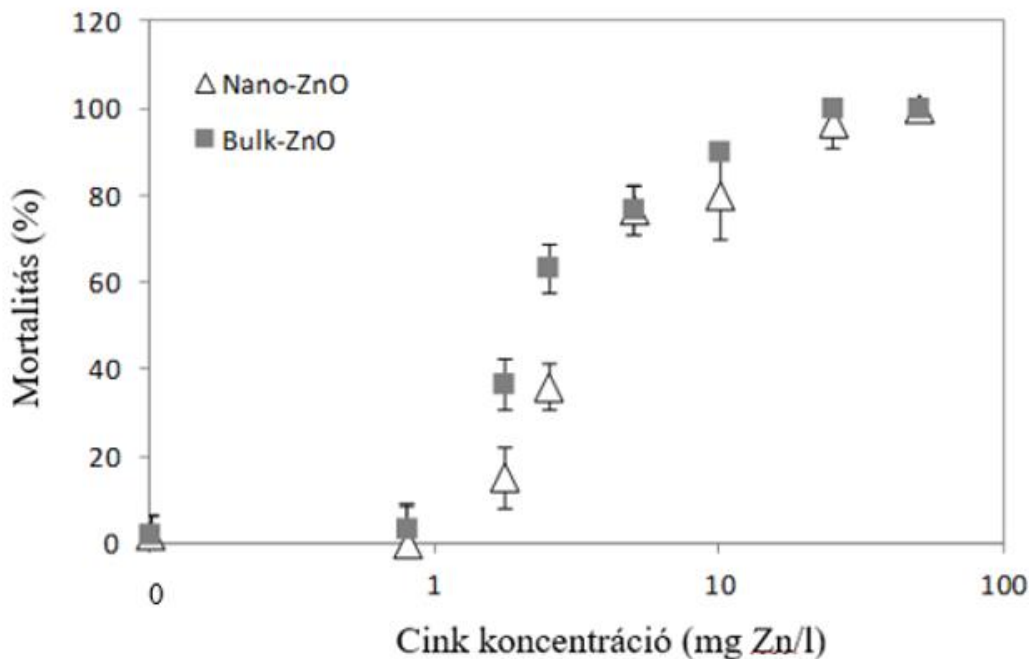
Toxicitási és elemfelvételi vizsgálatokat végeztem Szegedi Tudományegyetem által célzottan előállított nano-ZnO (~25 nm), illetve bulk-ZnO (~221 nm) felhasználásával.

4.2.1 Toxicitási tesztek eredményei

A toxicitási tesztek 24 órás expozíciót követő leolvasás eredményeit logaritmikus skálán ábrázoltam, a hibasávok a szórások értékét mutatják. Koncentráció-függő mortalitást tapasztaltam mindkét fonálféreg fajnál, mind a nano-ZnO, mind pedig a bulk-ZnO alkalmazása esetén a 24 órás expozíciós idő után (19. ábra és 20. ábra). A kontrollban mindkét faj esetén 10% alatti volt a pusztulás, mely – egzakt érvényességi küszöb híján is – azt mutatja, hogy a tesztek megbízhatóan működtek, tehát azok eredményeit érvényesnek tekinthetjük.



19. ábra *X. vuittenezi* mortalitása 24 órás expozíció után

20. ábra *P. redivivus* mortalitása 24 órás expozíció után

A ZnO-nak a növényi táplálkozású *X. vuittenezi* mortalitására gyakorolt toxikus hatását a részecskeméret szignifikánsan befolyásolta (kétutas ANOVA, $F = 247,95$, $p < 0,001$). A nano-ZnO toxikus hatása már 1,75 mg/l koncentrációban is szignifikánsnak bizonyult a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). Már 5 mg Zn/l koncentráció is teljes mértékű (100%-os) mortalitást idézett elő a *X. vuittenezi*-re 24 óra után. A 8. táblázatban LC₁₀, illetve LC₅₀ értékek 95%-os konfidencia intervallumukkal szerepelnek. A nano-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 1,63 mg Zn/l volt. Ezzel szemben a bulk-ZnO jelentősen kisebb toxikus hatást mutatott a vizsgált koncentrációkban; 25 mg Zn/l volt az első koncentráció, ahol szignifikáns ($p < 0,05$) mortalitás-növekedést regisztráltunk a kontrollhoz képest. A bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 57,77 mg Zn/l volt.

A ZnO részecskemérete a bakteriális táplálkozású fonálféreg fajra gyakorolt toxicitást is szignifikáns mértékben befolyásolta (kétutas ANOVA, $F = 12,50$, $p < 0,001$). Mindkét anyag szignifikánsan növelte a *Panagrellus redivivus* nőtények mortalitását a kontrollhoz képest már a 1,75 mg Zn/l koncentrációtól kezdődően. A nano-ZnO LC₅₀ értéke 3,34 mg Zn/l, míg a bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 2,38 mg Zn/l.

8. táblázat Nano-ZnO és bulk-ZnO LC₁₀ és LC₅₀ értékei 24 órás expozíció után

	<i>X. vuittenezi</i>		<i>P. redivivus</i>	
	LC ₁₀ (mg/l)	LC ₅₀ (mg/l)	LC ₁₀ (mg/l)	LC ₅₀ (mg/l)
Nano-ZnO	1,20 (1,19; 1,20)	1,63 (1,63; 1,63)	1,21 (0,50; 1,74)	3,34 (2,57; 4,50)
Bulk ZnO	9,82 (0; 20,03)	57,77 (32,32; N,d*)	0,83 (0,31; 1,23)	2,38 (1,82; 3,13)

*N.d=nem meghatározható



4.3 Célzottan előállított ZnO elemfelvételi vizsgálatok eredményei

Mindkét faj kezeletlen egyedeinek elemtartalmára vonatkozó összefoglaló eredmények a 9. táblázatban láthatók. Az állatok elemtartamára vonatkozó eredményeket (átlag (\pm szórás)) minden esetben olyan módon adtam meg, hogy az adott elem ng-ban kifejezett mennyisége elosztásra került az állat μ g-ban kifejezett testtömegével.

9. táblázat Kezeletlen *X. vuittenezi* és *P. redivivus* egyedek elemtartalmának összesítő táblázata

	Ca	Cu	Fe	K	P	S	Zn
<i>X. vuittenezi</i>	0,79 ($\pm 0,09$)	0,09 ($\pm 0,08$)	0,14 ($\pm 0,06$)	1,95 ($\pm 0,19$)	6,80 ($\pm 5,33$)	3,23 ($\pm 0,79$)	0,26 ($\pm 0,07$)
<i>P. redivivus</i>	2,4 ($\pm 0,97$)	0,02 ($\pm 0,02$)	0,29 ($\pm 0,27$)	3,09 ($\pm 0,52$)	7,67 ($\pm 3,81$)	2,47 ($\pm 1,28$)	0,11 ($\pm 0,09$)

4.3.1 Cinktartalom

A 10. táblázat bemutatja az állatok testében mért cink mennyiségét. Mindkét faj esetében koncentrációfüggő hatás volt megfigyelhető (többutas ANOVA, $F = 10,47$, $p < 0,001$). A részecskeméret nem befolyásolta az állatokban mért cinktartalmat egyik faj esetében sem. A *X. vuittenezi* fajnál a 25 mg Zn/l koncentrációjú tesztközeg eredményezett szignifikánsan magasabb cinktartalmat a kontrollhoz képest, nano- és bulk-ZnO esetén is. Ezzel szemben a *P. redivivus* esetén már 5 mg/l koncentrációtól szignifikánsan több cink volt mérhető az állatok testében a kontrollhoz képest. A testtömegre számított cinkmennyiség alapján a *P. redivivus* szignifikánsan többet vett fel a cinkből, mint a másik faj (többutas ANOVA, $F = 5,31$, $p = 0,025$).

10. táblázat Fonálférgek cinktartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	0,26 ($\pm 0,073$)	0,11 ($\pm 0,09$)
Nano-ZnO	1 mg/l	0,83 ($\pm 0,120$)	0,44 ($\pm 0,264$)
	5 mg/l	0,70 ($\pm 0,091$)	1,62 ($\pm 0,237$)**
	25 mg/l	2,15 ($\pm 0,727$)**	1,66 ($\pm 0,523$)**
Bulk-ZnO	1 mg/l	0,63 ($\pm 0,344$)	0,83 ($\pm 0,385$)
	5 mg/l	0,70 ($\pm 0,223$)	1,48 ($\pm 0,575$)*
	25 mg/l	1,17 ($\pm 0,437$)*	1,33 ($\pm 0,602$)*

A fonálférgek cinktartalma ng/ μ g testtömegre van megadva. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (ANOVA, post hoc Dunnett) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

4.3.2 Káliumtartalom

Szignifikáns különbség volt a két faj káliumtartalmában (többutas ANOVA, $p < 0,001$; $F = 16,5$). A két faj közül a *X. vuittenezi* kezeletlen példányai szignifikánsan kevesebb káliumot tartalmaztak ($1,95 \pm 0,18$ ng/ μ g), mint a *P. redivivus* faj kezeletlen egyedei ($3,09 \pm 0,52$ ng/ μ g). Nem volt szignifikáns eltérés a *X. vuittenezi* faj esetében a kontrollhoz képest sem a nano, sem bulk-ZnO esetén, kivéve az 1 mg/l nano-ZnO koncentrációval kezelt állatok esetén, amelyek közül a nano-ZnO kezelésben részesült példányok káliumtartalma kisebb volt a többiekénél. Ezzel szemben a másik faj, a *P. redivivus* kezelt egyedeinek káliumtartalma szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest. A szemcseméretnek nem volt szignifikáns hatása az állatok káliumtartalmára.

11. táblázat Fonálférgek káliumtartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	1,95 ($\pm 0,186$)	3,09 ($\pm 0,523$)
Nano-ZnO	1 mg/l	0,73 ($\pm 0,253$)	1,04 ($\pm 0,347$)
	5 mg/l	1,45 ($\pm 0,547$)	0,58 ($\pm 0,210$)***
	25 mg/l	1,74 ($\pm 0,413$)	0,67 ($\pm 0,427$)**
Bulk-ZnO	1 mg/l	1,06 ($\pm 0,411$)*	0,77 ($\pm 0,695$)**
	5 mg/l	1,34 ($\pm 0,204$)	0,68 ($\pm 0,354$)**
	25 mg/l	1,84 ($\pm 0,480$)	0,84 ($\pm 0,343$)**

A fonálférgek elemtartalma ng/ μ g testtömegre van megadva. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (ANOVA, post hoc Dunnett) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

4.3.3 Kalciumtartalom

Szignifikáns különbség volt a két faj kalciumtartalmában a kontroll és kezelt állatok esetén is. A *P. redivivus* faj kontroll egyedeiben $2,44 \pm 0,97$ ng/ μ g kalcium volt mérhető, ez a másik faj esetén $0,79 \pm 0,09$ ng/ μ g volt. Sem a nano, sem a bulk-ZnO kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a *X. vuittenezi* faj egyedeinek kalciumtartalmára, ezzel szemben *P. redivivus* egyedinek kalciumtartalma a nano-ZnO kezelés hatására csökkent. A szemcseméretnek nem volt szignifikáns hatása az állatok testében mérhető kalcium mennyiségére (ANOVA, $F = 1,26$; $p = 0,27$).



12. táblázat Fonálférgek kalciumtartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után.

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	0,79 (±0,092)	2,44 (±0,976)
Nano-ZnO	1 mg/l	0,63 (±0,076)	0,97 (±0,357)**
	5 mg/l	0,76 (±0,238)	0,70 (±0,296)***
	25 mg/l	0,69 (±0,178)	1,05 (±0,014)**
Bulk-ZnO	1 mg/l	0,46 (±0,139)	1,55 (±0,51)
	5 mg/l	0,6 (±0,160)	1,14 (±0,562)*
	25 mg/l	0,61 (±0,316)	0,92 (±0,427)**

A fonálférgek elemtartalma ng/μg testtömegre van megadva. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (ANOVA, post hoc Dunnett) * = p <0,05; ** = p <0,01; ***=p<0,001).

4.3.4 Réztartalom

A *P. redivivus* réztartalma gyakorlatilag nem változott a ZnO hatására. *X. vuittenezi*-nél csökkenés volt megfigyelhető. De nem volt szignifikáns különbség a kontroll és kezelt állatok réztartalma között egyik faj esetében sem. A *X. vuittenezi* kontroll egyedeinek réztartalma 0,09 (±0,08) ng/μg volt, a *P. redivivus* kontroll egyedeiben ennél alacsonyabb 0,02 ng/μg átlagos réztartalom volt mérhető, nem volt szignifikáns különbség a két faj egyedei között.

13. táblázat Fonálférgek réztartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	0,09 (±0,082)	0,02 (±0,018)
Nano-ZnO	1 mg/l	0,06 (±0,01)	0,02 (±0,012)
	5 mg/l	0,06 (±0,028)	0,02 (±0,007)
	25 mg/l	0,06 (±0,021)	0,02 (±0,014)
Bulk-ZnO	1 mg/l	0,05 (±0,037)	0,02 (±0,008)
	5 mg/l	0,05 (±0,012)	0,02 (±0,004)
	25 mg/l	0,04 (±0,019)	0,02 (±0,008)

A fonálférgek elemtartalma ng/μg testtömegre van megadva.



4.3.5 Vastartalom

Nem volt szignifikáns hatása a ZnO kezelésnek a vastartalomra, sem a nano, sem a bulk forma esetén. A *X. vuittenezi* kontroll egyedeinek vastartalma $0,14 (\pm 0,06)$ ng/ μ g volt, a *P. redivivus* kontroll egyedeinél $0,29 (\pm 0,27)$ ng/ μ g vastartalom volt mérhető. A kezelés hatására a vastartalomban csökkenő tendencia volt megfigyelhető *P. redivivus* esetén.

14. táblázat Fonálférgek vastartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	0,14 ($\pm 0,059$)	0,29 ($\pm 0,271$)
Nano-ZnO	1 mg/l	0,16 ($\pm 0,063$)	0,19 ($\pm 0,257$)
	5 mg/l	0,21 ($\pm 0,112$)	0,09 ($\pm 0,031$)
	25 mg/l	0,22 ($\pm 0,157$)	0,15 ($\pm 0,138$)
Bulk-ZnO	1 mg/l	0,14 ($\pm 0,076$)	0,16 ($\pm 0,032$)
	5 mg/l	0,10 ($\pm 0,034$)	0,08 ($\pm 0,015$)
	25 mg/l	0,12 ($\pm 0,045$)	0,06 ($\pm 0,011$)

A fonálférgek elemtartalma ng/ μ g testtömegre van megadva.

4.3.6 Foszfortartalom

Figyelembe véve a két faj esetén mért összes adatot, elmondható, hogy a cink kezelésnek általánosságban hatása volt az állatok foszfortartalmára ($p < 0,05$; $F = 2,75$). Ezzel szemben sem a fajnak, sem pedig a szemcseméretnek nem volt hatása erre a paraméterre. Hasonló foszfortartalom volt mérhető a két faj esetén. A *X. vuittenezi* kontroll egyedeinek foszfortartalma $6,80 (\pm 5,33)$ ng/ μ g volt, míg a *P. redivivus* kontroll egyedeinél $7,67 (\pm 3,81)$ ng/ μ g foszfortartalom volt mérhető.

15. táblázat Fonálférgek foszfortartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	6,80 ($\pm 5,335$)	7,67 ($\pm 3,809$)
Nano-ZnO	1 mg/l	4,51 ($\pm 1,295$)	4,74 ($\pm 2,452$)
	5 mg/l	3,65 ($\pm 1,095$)	4,06 ($\pm 1,827$)
	25 mg/l	10,20 ($\pm 6,347$)	5,52 ($\pm 4,007$)
Bulk-ZnO	1 mg/l	7,58 ($\pm 2,981$)	5,31 ($\pm 1,386$)
	5 mg/l	4,51 ($\pm 2,335$)	4,58 ($\pm 0,945$)
	25 mg/l	5,76 ($\pm 1,706$)	4,22 ($\pm 1,175$)

A fonálférgek elemtartalma ng/ μ g testtömegre van megadva.



4.3.7 Kéntartalom

Nem volt szignifikáns hatása a ZnO kezelésnek az állatok kéntartalmára, sem a nano, sem a bulk szemcseméretű anyag esetén. Hasonló kéntartalom volt mérhető mindkét faj kezeletlen egyedeiben. A *X. vuittenezi* kontroll egyedeinek kéntartalma 3,23 ($\pm 0,79$) ng/ μ g volt, a *P. redivivus* kontroll egyedeinél 2,47 ($\pm 1,28$) ng/ μ g kéntartalom volt mérhető.

16. táblázat Fonálférgek kéntartalma *X. vuittenezi* (A) és *P. redivivus* (B) esetében 24 órás expozíciós idő után

Vizsgálati anyag	Koncentráció	<i>X. vuittenezi</i>	<i>P. redivivus</i>
Kontroll	0 mg/l	3,23 ($\pm 0,786$)	2,47 ($\pm 1,284$)
Nano-ZnO	1 mg/l	3,24 ($\pm 0,920$)	1,63 ($\pm 1,062$)
	5 mg/l	3,06 ($\pm 0,889$)	1,45 ($\pm 0,774$)
	25 mg/l	5,02 ($\pm 2,077$)	1,34 ($\pm 0,563$)
Bulk-ZnO	1 mg/l	3,77 ($\pm 1,497$)	1,92 ($\pm 0,653$)
	5 mg/l	2,72 ($\pm 1,308$)	1,59 ($\pm 0,374$)
	25 mg/l	2,50 ($\pm 0,796$)	1,82 ($\pm 0,571$)

A fonálférgek elemtartalma ng/ μ g testtömegre van megadva.



4.4 Új tudományos eredmények

1. A *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg fajjal poliészter mikrotitráló lemezen Milli-Q vizes közegben elvégzett ökotoxikológiai vizsgálat során megállapítottam, hogy a növényi táplálkozású *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg faj jelentősen nagyobb érzékenységet mutat a nano- mint a nagyszemcsés ZnO mérgező hatása iránt.

2. A *Xiphinema vuittenezi* és a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajokkal poliészter mikrotitráló lemezen Milli-Q vizes közegben elvégzett ökotoxikológiai vizsgálat során megállapítottam, hogy a fitofág *Xiphinema vuittenezi* és a bakteriális táplálkozású *Panagrellus redivivus* azonos érzékenységet mutat a 25 nm-es méretű nano-ZnO mérgező hatása iránt.

3. A vizsgált fonálféreg fajok elemfelvételi viszonyaira, illetve elemtartalmára vonatkozóan megállapítottam, hogy az általam alkalmazott kísérleti körülmények között a *Xiphinema vuittenezi* és a *Panagrellus redivivus* faj kezeletlen egyedei között cinktartalom, vastartalom, foszfortartalom, kéntartalom, réztartalom tekintetében nincs különbség. A *Xiphinema vuittenezi* és a *Panagrellus redivivus* faj kezeletlen egyedei különböztek azonban káliumtartalom, illetve kalciumtartalom tekintetében. Mindkét elem a *Panagrellus redivivus* egyedeiben fordult elő szignifikánsan nagyobb mennyiségben.

4. Megállapítottam, hogy a nano- és a nagyszemcsés ZnO expozíció hatására változhat az állatok elemtartalma, amennyiben a cink-oxid kezelés csökkentette a kezelt *Panagrellus redivivus* egyedek kalciumtartalmát, illetve káliumtartalmát.



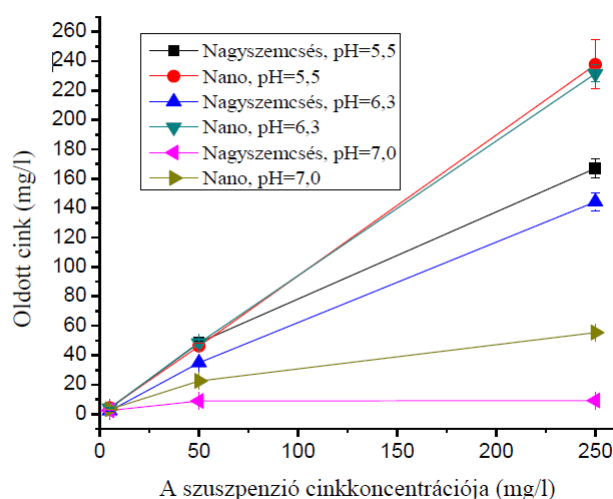
5. Következtetések és javaslatok

5.1 Kereskedelmi forgalomban kapható ZnO hatásai

5.1.1 Toxicitás

A ZnO vegyületek jellemző méreteire vonatkozó, Dr. Sávolly Zoltánnal végzett vizsgálatok alapján kiderült, hogy a nanoszemcsés ZnO részecskemérete 150 nm és 400 nm között van, tehát szigorúan véve nem tekinthető nanoanyagoknak. Megállapítást nyert az is, hogy a vizsgálati körülmények között a részecskék aggregációja nem volt jelentős. A *X. vuittenezi* fajra a nano-ZnO sokkal toxikusabbnak bizonyult, mint nagyszemcsés megfelelője, ugyanakkor a mortalitás mértéke közel azonos volt a ZnSO₄ oldat mortalitására gyakorolt hatásával.

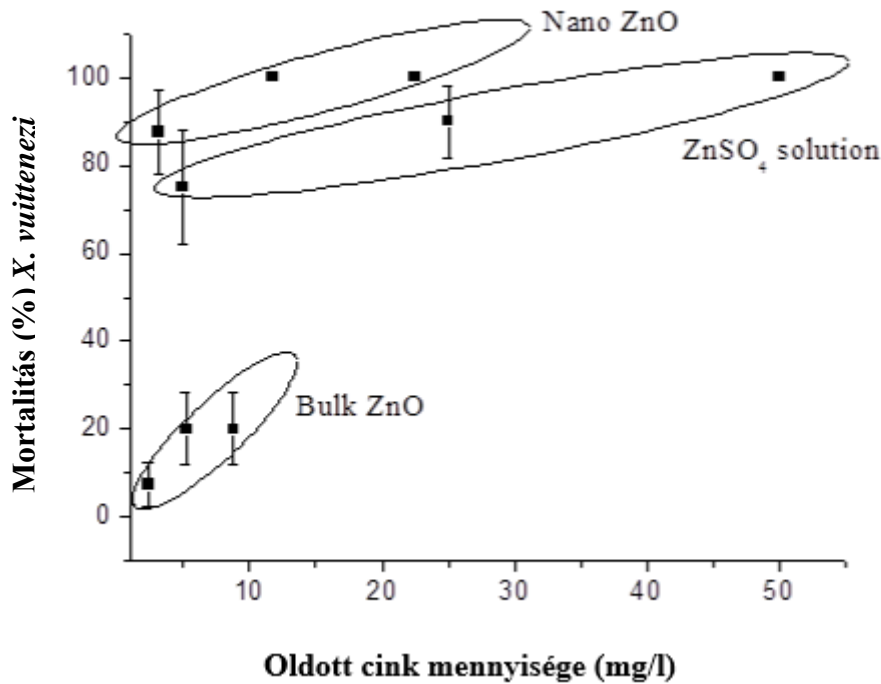
Tehát annak ellenére, hogy a nano-ZnO-ként forgalmazott készítmény tényleges szemcsemérete alapján nem sorolható a nanoanyagok közé, a nagyszemcsés megfelelőjétől eltérő hatásokat gyakorolt a fonálférgekre. A ZnSO₄ oldattal végzett vizsgálatok alapján az anyag toxicitásaért a kioldódott Zn²⁺ ionok a felelősök. Sávolly et al. (2016) vizsgálta az általam is használt nano és bulk, valamint nagyszemcsés cink-oxid szuszpenziók oldott cink tartalmát különböző pH tartományokban. A nano szerkezetű ZnO szuszpenziók esetén több volt a kioldódott cink (21. ábra). A kioldódott cink mennyiségét befolyásolta a szuszpenziók kémhatása. Alacsonyabb pH esetén mindkét szemcseméretű anyagból jelentősen több cink oldódott ki.



21. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk- ZnO szuszpenziók oldott cink tartalma, különböző pH tartományban (Forrás: Sávolly et al., 2016)

A nano-ZnO gyakorlatilag a teljes mennyiségben, a bulk-ZnO-nak több mint 50% oldatba megy pH=5,5 és 6,3 kémhatás értékeknél.

A szuszpenziók cink koncentrációja alapján az oldott cink mennyiségét összevetettük az adott szuszpenzió által előidézett 24 órás mortalitás értékeivel (22. ábra). Nano-ZnO és a $ZnSO_4$ toxicitása meghaladja a bulk-ZnO toxicitását, még akkor is mikor az oldott cink mennyisége 10 mg/l alatti.



22. ábra Kereskedelmi forgalomban kapható nano- és bulk-ZnO mortalitásra gyakorolt hatása 24 órás expozíció esetén az oldott cink mennyiségének függvényében

5.1.2 TXRF vizsgálatok eredménye

A talajoldattal végzett vizsgálatok eredményét összevetve Dr. Sávoly Zoltán korábbi, kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-ra vonatkozó mérési eredményeivel megállapítható, hogy a talajoldat jelenléte szignifikánsan csökkentette a kezelt állatok testében mérhető cinktartalmat (Sávoly et al., 2016). Ezt feltehetően a talajoldat szervesanyag tartalmának kölcsönhatása okozta a cink-oxid részecsekkel. A szervesanyagok jelenléte és a tesztközeg milyensége nagymértékben befolyásolhatja a kioldódott cinkionok mennyiségét. A fulvosav, mely az egyik legfontosabb természetes szervesanyag, csökkenheti a kioldódott szabad cink mennyiségét (Miao et al., 2010). A foszfor jelenlétének is hasonló hatása lehet (Li et al., 2011). Az általam használt talajoldat foszfortartalma $(3,91 \pm 1,56)$ mg/l volt.



5.2 Célzottan előállított ZnO hatásai

A kereskedelmi forgalomban kapható nano-ZnO tulajdonságainak vizsgálata során kiderült, hogy a részecskék jellemző mérete felette van a 100 nm-es küszöbértéknek. Ezért a Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai tanszékén Kukovecz Ákos és kutatócsoportja kérésünkre célzottan előállított ZnO nanorészecskéket, illetve nagyszemcsés megfelelőjüket. Ezt követően a Szegedi Tudományegyetem által előállított nano- és bulk ZnO toxicitásának és elemfelvételre gyakorolt hatásainak vizsgálatával folytattam a munkát.

5.2.1 Toxicitás

A Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék munkatársai által előállított nano- és bulk-ZnO *P. redivivus* mortalitására gyakorolt hatása megegyező volt. Ez az eredmény összhangban van Wang et al. (2009) eredményeivel. Wang és munkatársai az idézett vizsgálatban *C. elegans* L1 lárvastádiumába tartozó teszt példányokat alkalmaztak, hogy vizsgálják és összehasonlítsák a nano-ZnO és bulk-ZnO, valamint a ZnCl₂ toxikus hatását. Ebben a vizsgálatban szintén nagy tisztaságú vizet használtak tesztközegként, azonban az állatoknak táplálékot is biztosítottak a 24 órás teszt alatt. Az LC₅₀ értékek lényegében megegyeztek a kétféle szemcseméretű ZnO esetén. A nano-ZnO (20 nm) LC₅₀ értéke 2,2 mg/L, illetve a bulk ZnO (532 nm) értéke 2,3 mg/ volt. Ezek az eredmények hasonlóak az általunk kapott nano-ZnO *X. vuittenezi* mortalitása alapján számolt LC₅₀ értékéhez, illetve nano-ZnO és bulk-ZnO *P. redivivus*-ra gyakorolt mortalitás értékéhez. Egy lehetséges magyarázata annak, hogy a növényi nedvszívó *X. vuittenezi* jobban tolerálja a bulk-ZnO terhelést, hogy a kontroll állatok eleve valamennyivel több cinket tartalmaztak, mint a *P. redivivus* faj egyedei. Emellett a nano-ZnO-nak sokkal erőteljesebb a toxikus hatása a növényi nedvszívó fajra. Ez az eredmény összhangban van a kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-ra kapott eredményeinkkel. Ebben a vizsgálatban is a nano-ZnO toxikusabbnak bizonyult, mint a ZnCl₂ vagy a bulk-ZnO a *X. vuittenezi* fajra. Egy másik, *C. elegans* fajon végzett vizsgálatban, melyben szubletális végpontokat is vizsgáltak, kimutatták, hogy a nano-ZnO sokkal erőteljesebb hatást gyakorol egyes tesztvégpontokra a bulk-ZnO-hoz képest. Ilyen például az utódszám csökkenés, illetve a túlszabályozott gén expresszió (Gupta et al., 2015). Valamint a nano-ZnO esetén erőteljesebb a fototoxikus hatás (Ma et al., 2011). Ma et al. (2011) vizsgálta a ZnO részecskék toxikus hatását sötétben, illetve természetes napfény, valamint mesterséges laboratóriumi fényel történő megvilágítás hatására. Sötétben végzett 24 órás teszt alatt mortalitás nem volt tapasztalható. Laboratóriumi fényel történő megvilágítás hatására a becsült LC₅₀ 60-80 mg Zn/l értéket adott nano-ZnO esetén. Ez a sokkal magasabb, mint az általunk kapott eredmény a szintén baktériumfogyasztó, *P. redivivus*-ra. Egy másik, kifejlett *C. elegans*-on végzett vizsgálatban a 24 órás LC₅₀ érték 100 nm, illetve 10 nm ZnO részecskék esetén



1,0 g/l és 0,62 g/l volt (Gupta et al., 2015). Ebben a vizsgálatban a tesztközeg többek között kalcium-klorid és kálium-klorid tartalmú K-medium volt, illetve az állatok nem kaptak táplálékot a kísérlet alatt.

Eredményeink rámutatnak a két általunk tesztorganizmusként alkalmazott faj érzékenysége közti különbségre, amely azonban nem feltétlenül esik egybe az eddigi ismeretek alapján elvárható trendekkel. A *X. vuittenezi* faj a Dorylaimida rendbe tartozik, amelyet általánosságban a leginkább stresszérzékeny csoportként tartanak számon (Bongers, 1990). Bár e faj cinkterhelésre adott komparatív (más fajhoz viszonyított) stresszválaszai egyáltalán nem ismeretesek a szakirodalomból, krómterhelés hatásait vizsgálva Horváth et al. (2010) egy másik fitofág fonálféreggel, a *Rotylenchus buxophilus* (Golden, 1956) fajjal összehasonlítva azt találta, hogy a *X. vuittenezi* érzékenyebb, amennyiben azonos szintű mortalitást már tizedakkora koncentráció is kivált nála, mint a *R. buxophilus*-nál.

Ezzel szemben a *P. redivivus*-t is magába foglaló Rhabditida rend egyes csoportjait a leginkább stressztűrő szabadon élő fonálféreg taxonok közé sorolják. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a nehézfémterhelések iránt leginkább toleráns Rhabditida csoportnak több kutatás szerint sem az efemer életmódú családok (Rhabditidae és a *P. redivivus*-t is magába foglaló Panagrolaimidae) bizonyultak, hanem a talajlakó fonálféreg együttesekben igen gyakran domináns szerepet betöltő Cephalobidae család (Bongers, 1990, Nagy, 1999, Nagy, 2009).

Vizsgálataim eredménye alapján a *X. vuittenezi* és a *P. redivivus* hasonlóan reagált a nano-ZnO-ra. Boyd et al. (2003) azt az eredményt kapta, talajban, illetve vizes közegben végezett mortalitási teszteken keresztül, hogy a *P. redivivus* kevésbé érzékeny rézre mint, két másik bakterivor fonálféreg, a *C. elegans* és a *Pristionchus pacificus*. Egy, a *P. redivivus*-hoz rendszertanilag közel álló fajon (*P. silusiae*) végzett toxicitási tesztek hét nehézfémrel Haight et al. (1982). A nehézfémek hatással voltak a posztembrionális fejlődésre, növekedésgátlást eredményezve, ez a cink esetében azonban csak a legnagyobb koncentráció (500 mg/l) esetén mutatott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest. A 24 órás LC₅₀ a kifejlett állatok esetén 225 mg/l volt. Leitgeb et al. (2007) a munkám során is tesztelt fajon, a *P. redivivus*-on vizsgálták egy korábbi cink- és ólombánya szennyezett talajából származó kivonat szaporodásgátló hatását. Eredményeik alapján sem a 268 mg/kg cinket tartalmazó szennyezett talajból származó extraktum, sem pedig a 21 mg/kg cinket tartalmazó, nem szennyezett kerti talajból származó extraktum nem volt káros hatással a faj szaporodására.

A cinkion felszabadulása fontos szerepet játszik a cink-oxid toxicitásában. A felszabadult cinkionok mennyisége függ a cink-oxid fiziko-kémiai tulajdonságaitól, illetve környezeti tényezőtől (például pH, hőmérséklet, és szervesanyag jelenléte) (Ma et al., 2013). A Szegedi Tudományegyetemen, Dr. Kukovecz Ákos csoportja által létrehozott cink-oxid részecskékkel



végzett vizsgálat során, a kioldódott Zn^{2+} mennyiségének mérése nem történt meg. Azonban a kereskedelmi forgalomban elérhető cink-oxiddal végzett vizsgálat során az oldott cinktartalmat TXRF módszerrel meghatároztuk. A nano-ZnO oldhatósága meghaladta a bulk-ZnO oldhatóságát, mind a négy vizsgált pH tartományban (Sávoly et al., 2016). Más vizsgálatok is arra az eredményre jutottak, hogy kisebb ZnO részecskék nagyobb oldhatóságot mutatnak (Borm et al., 2006; Mudunkotuwa et al., 2012; Reed et al., 2012). Talajlakó ugróvillással (*Folsomia candida*) végzett vizsgálatok eredménye alapján a nano-ZnO toxikus hatását a kioldódott cinkionok okozzák és nem részecskeméret (Kool et al., 2011). A ZnO nanorészecskék jelenléte által kiváltott megnövekedett ROS mennyiség és a DNS károsodása tenyésztett sejtekben, kapcsolatban áll a cinkionok kioldódásával (Annangi et al., 2015). Ez magyarázatot jelenthet a *X. vuittenezi*-re gyakorolt toxikus hatásra is. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy a vizsgálataim során alkalmazott nano-ZnO koncentrációk nagyobbak voltak, mint a becsült környezeti koncentrációk. Sun et al. (2014) modellezte a mesterségesen előállított nanoanyagok kikerülését a környezetbe. Számításai alapján a nano-ZnO környezeti koncentrációja $0,09 \mu\text{g/l}$ -re becsülhető a felszíni vizekben, illetve 24 mg/kg szennyvíziszapban. A nano-ZnO koncentrációk éves növekedésének mértékét $0,01 \mu\text{g/kg}$ -re becsülte az urbanizált területek talajában. Ezidáig igen kevés kísérletben vizsgálták a nano-ZnO hatásait környezetileg releváns koncentrációk alkalmazásával. Wu et al. (2013) vizsgálta $0,0005$ - $50 \mu\text{g/l}$ koncentrációban a 30 nm SiO_2 , TiO_2 és ZnO nanorészecskék *C. elegans*-ra gyakorolt hatását. A vizsgálatban a ZnO nanorészecskéknek volt a legtoxikusabb hatásuk a többi vizsgált részecskéhez képest. A nano-ZnO szignifikáns mértékben növelte a mortalitást az $50 \mu\text{g/l}$ koncentrációban.

Emellett fontos megjegyezni, hogy már a $0,05 \mu\text{g/l}$ koncentráció is szignifikánsan befolyásolta egyes nem letális végpontok alakulását: az állatok mozgásintenzitását csökkentette, a ROS termelődését pedig növelte (Wu et al., 2013).

Néhány tanulmány vizsgálta a cinktolerancia hatásmechanizmusát *C. elegans* faj segítségével (Murphy et al., 2011; Bruinsma et al., 2008). Murphy et al. (2011) úgy találta, hogy a hisztidin befolyásolhatja a cink metabolizmusát, ezáltal védelmet biztosíthat a cink toxikus hatásával szemben. Polak et al. (2014) vizsgálta metallothioneinek szerepét a ZnO toxicitásának kivédésére *C. elegans*-ban. Raman spektroszkópiával szignifikáns különbségeket találtak a kezelt fémérzékeny mutáns fonálférgék feji- és farokrégiója között.



5.2.2 Elemfelvételi vizsgálatok

Elemfelvételi vizsgálatokat végeztem három cinkkoncentrációval. Az elemfelvételi vizsgálatokban alkalmazott koncentrációk az előzetes vizsgálatok eredményei alapján kerültek kiválasztásra. A két vizsgált faj kezelt egyedek elemtartalma eltérő módon változott a kezelések hatására. A cinkfelvétel szignifikánsan nagyobb volt a *P. redivivus* faj esetén, mint a *X. vuittenezi* faj esetén, valamint az utóbbi faj elemtartalmára összességében kevésbé volt hatással a kezelés. A *X. vuittenezi* fajnál csak a legnagyobb alkalmazott koncentráció (25 mg Zn/l) eredményezett szignifikáns cinktartalom növekedést a kontroll egyedekhez képest. Hasonló eredmény volt tapasztalható a kereskedelmi forgalomban kapható ZnO-dal történt kezelés után Sávoly et al. (2016) vizsgálatában. Ezzel szemben a bakterivor *P. redivivus* vizsgálata során már 5 mg Zn/l koncentrációjú kezelés esetén szignifikánsan több cink volt mérhető az állatokban. A szemcseméretnek nem volt szignifikáns hatása a cinkfelvételre egyik faj esetében sem.

A két faj között tapasztalt különbség magyarázható a fajok közötti táplálkozásbeli különbséggel. A *X. vuittenezi* növényi nedvszívó fonálféreg szájszuronyával a növények hajszálgöckereit szívogatva táplálkozik, míg a bakterivor *P. redivivus* a baktériumokat egészben fogyasztja az azokat körülvevő közeggel együtt. A szintén baktériumokkal táplálkozó *C. elegans* esetében bizonyított, hogy táplálkozása során méret alapján szelektál. Emiatt nem csak baktérium sejteket fogyaszt el, hanem olyan részecskéket is, amelyek 5 µm-nél kisebbek (Donkin and Dusenbery 1993). Fang-Yen et al. (2009) videófelvételek segítségével azonosított két szűrőmechanizmust, amelyek lehetővé teszik a táplálék részecskeméret alapján történő kiválasztását. Fentiek alapján a közeli rokon *P. redivivus* esetén is magyarázható lehet a kezelt állatok testében mérhető magasabb cinkkoncentráció azzal is, hogy fogyasztottak a ZnO-részecskékből a kezelés alatt. A vizsgálatban használt TXRF módszerrel az állatok testének teljes cinktartalma mérhető, azonban az nem megállapítható, hogy a cink hol helyezkedik el az állatok testén belül. Sávoly et al (2015) egy korábbi vizsgálatban egyéb, elemeloszlás térképezésre is alkalmas módszerekkel (EPMA, XANES) vizsgálta egyes elemek *X. vuittenezi* testén belüli elhelyezkedését. Ez alapján megállapítható volt, hogy még az obligát növényi táplálkozású *X. vuittenezi* fajnál is bizonyos mennyiség a vizsgálati anyagból bekerült az egyedek testébe a szájszerven és az ivarnyíláson keresztül. Ezt azonban nem lehet szabályszerűnek nevezni, sokkal inkább az agónia során bekövetkezett kényszermozgások, illetve a záróizmok működési zavarának eredménye lehetett. Az állatok ugyanis nem táplálkoztak a kezelés alatt, erre nem is lett volna lehetőségük, mivel a kezelés egy vizes rendszerben zajlott, amelyben nem kapott helyet semmilyen tápnövény gyökere. Korábban Howell 1982-ben két fonálféreg faj fémtartalmát vizsgálta, amelyek szennyezett és nem szennyezett területekről származtak. Mindkét faj esetében azon egyedek, melyek szennyezett területekről származtak, több cinket tartalmaztak.



A célzottan előállított cink-oxid vizsgálata során a cinktartalom mellett egyéb elemek mennyiségét is meghatároztuk TXRF módszerrel. Egy korábbi vizsgálatban Sávoly et al. (2012) a réz kezelés makro- és mikroelemekre gyakorolt hatását vizsgálta. A vizsgált réz koncentrációknak cinktartalmat leszámítva nem volt hatása az elemtartalomra. Az állatok testében megnövekedett réztartalom a cinktartalom csökkenését eredményezte, azonban más elemek mennyiségét nem befolyásolta. Az általam végzett elemfelvételi vizsgálatban a cinkkezelésnek nem volt hatása a réztartalomra.

A nano-ZnO és a bulk-ZnO kezelés sem volt szignifikáns hatással az állatok kalciumtartalmára a *X. vuittenezi* esetében. Ezzel szemben a *P. redivivus* faj kezelt egyedeinek kalcium- és káliumtartalma is szignifikánsan csökkent, mindkét szemcseméretű ZnO-dal történő kezelés hatására. A kereskedelmi forgalomban kapható ZnO, illetve a ZnSO₄ kezelés hatására sem változott az állatok kalciumtartalma *X. vuittenezi* esetén (Sávoly et al., 2016). A káliumtartalom szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest 50 mg/l koncentrációjú ZnO szuszpenziók esetén, illetve a ZnSO₄ esetén is. A káliumnak feltehetőleg fontos szerepe van a cink toxikokinetikájában. Ezt a *P. redivivus* testében mérhető káliumtartalom is alátámasztja. A *X. vuittenezi*-ben mérhető káliumkoncentráció csökkenése a bulk-ZnO-dal kezelt állatok esetén valamivel kisebb volt a nano-ZnO-hoz képest, de nem mutatott statisztikailag igazolható különbséget, többek között a viszonylag nagy szórások miatt. A ZnO valószínűleg hatással van a kalcium és kálium homeosztázisra, de ezt eddig leginkább emlős modellekben vizsgálták, fonálférgekre vonatkozóan pedig semmilyen szakirodalmi adatot nem sikerült találni. Huang et al. (2010) kimutatta, hogy 20 nm szemcseméretű ZnO citotoxicitást indukál a tenyésztett humán bronchiális hámszöveti sejtekben, és dózisfüggő növekedést mutat az intracelluláris térben. A ZnO citotoxicitásra gyakorolt hatását nagyobb koncentráció és hosszabb expozíciós idő növelte. ZnO nanorészecske injekciók után a kalcium- és vastartalom szignifikánsan kevesebb volt patkány agyszövetben, de a nátrium- és káliumtartalom nem változott (Amara et al., 2012).



6. Összefoglaló

A nanotechnológia a 100 nm alatti mérettartományba tartozó anyagokkal kapcsolatos gyakorlati ismereteket foglalja magába és az utóbbi évtizedekben az egyik leggyorsabban fejlődő, leginkább szerteágazó területté nőtte ki magát. Abból adódóan, hogy a nanorészecskéket tartalmazó termékek már a fogyasztók számára is számtalan formában elérhetővé váltak, tömeges kikerülésük a környezetbe meggátolhatatlan, e folyamat mértéke pedig egyre növekszik. A méretből származó különleges tulajdonságaik azonban, melyek miatt alkalmazásuk terjedőben van, veszélyeket is hordozhatnak magukban. A fotokatalitikusan aktív ZnO nanorészecskék a legnagyobb mennyiségben előállított nanoanyagok közé tartoznak, például naptejek, kozmetikumok meghatározó összetevőiként. A szabadon élő fonálférgek a talajfauna egyik meghatározó csoportját alkotják, a teresztris táplálékhálózatokban kulcsszerepet töltenek be. Biológiai, valamint ökológiai tulajdonságaik miatt mind laboratóriumi ökotoxikológiai tesztek kivitelezésére, mind pedig szabadföldi kísérletek elvégzésre alkalmasak. Különböző táplálkozási csoporthoz tartozó nematodák az esetleges szennyező hatásokra eltérően reagálhatnak. Annak ellenére, hogy a fonálférgek milyen változatos életmóddal és ökológiai funkciókkal jellemezhetők, az eddigi idevágó laboratóriumi kutatások lényegében szinte egyetlen fajhoz köthetők, mivel döntő mértékben a *Caenorhabditis elegans* nevű r-stratégista bakterivor táplálkozású fajjal végzett kísérletekből állnak rendelkezésre adatok nanorészecskék fonálférgekre gyakorolt hatásairól.

Doktori kutatásom során ZnO részecskék ökotoxikológiai hatásait és elemfelvételét vizsgáltam két szabadon élő, különböző életmenet-stratégiájú fonálféreg fajon. A *Xiphinema vuittenezi* nevű K-stratégista növényi táplálkozású fajon, illetve bakterivor táplálkozású r-stratégista *Panagrellus redivivus*-on vizsgáltam nano-ZnO, illetve bulk-ZnO hatásait mortalitási tesztekben. Vizsgáltam továbbá a kezelés hatását az állatok elemtartalmára, ezen keresztül pedig a cink felvételét és leadását. Kereskedelmi forgalomban elérhető nano- és bulk-ZnO hatásait vizsgáltam, illetve hasonlítottam össze ZnSO₄ hatásaival. Továbbá a Szegedi Tudományegyetem által célzottan előállított nano-ZnO (~25 nm), illetve bulk-ZnO (~221 nm) anyagokat használtam a munkám során. Teszt szervezeteim közül a kifejlett *Xiphinema vuittenezi* nőstényeket a talajmintákból a Cobb-féle dekantálásos-szűrési eljárás egy módosított változatával nyertem ki. A *Panagrellus redivivus* faj törzstenyészetét gabona alapú táptalajon tartják fent, a SZIE Állattani és Állatökológiai Tanszékén. Az akut toxicitási tesztek és az elemfelvételi vizsgálatok előkészítését mikrotitráló lemezekon, nagy tisztaságú vizes közegben végeztem el. Az állatokban a cink mellett további elemek mennyiségi viszonyait (K, Ca, Fe, Cu, P, S) határoztuk meg az egyedi minták mintahordozón történő tömény salétromsavas roncsolását követően TXRF spektrometria



segítségével. A mortalitási tesztek eredményei alapján elmondható, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható nano-ZnO és ZnSO₄ kezeléseknek hasonló hatása volt. Ezzel szemben a bulk-ZnO kevésbé volt toxikus a *Xiphinema vuittenezi* fajra.

A célzottan előállított ZnO-dal végzett vizsgálatok során koncentráció-függő mortalitást tapasztaltam mindkét fonálféreg fajnál. Mind a nano-ZnO, mind pedig a bulk-ZnO alkalmazása esetén a 24 órás expozíciós idő után a cinkfelvétel szignifikánsan nagyobb volt a nano és nagyszemcsés ZnO esetén. A cinknek a *X. vuittenezi* mortalitására gyakorolt hatását a részecskeméret szignifikánsan befolyásolta. A nano-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 1,63 mg Zn/l volt A bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 57,77 mg Zn/l volt. Ezzel szemben a *Panagrellus redivivus* faj esetén kapott értékek között nem volt jelentős különbség. A nano-ZnO LC₅₀ értéke 3,34 mg Zn/l, míg a bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 2,38 mg Zn/l. A cinktartalom tekintetében a *X. vuittenezi* fajnál a 25 mg Zn/l koncentrációjú tesztközeg alkalmazásakor, míg a *P. redivivus* esetén már 5 mg Zn/l koncentrációtól szignifikánsan több cink volt mérhető az állatok testében a kontrollhoz képest. A *P. redivivus* testtömegre számítva több cinket vett fel, mint növényi nedvszívó, *Xiphinema vuittenezi*. Szignifikáns különbség volt a két faj kezeletlen egyedeinek káliumtartalmában és kalciumtartalmában. A cink kezelés hatására a *P. redivivus* kezelt egyedeinek káliumtartalma, illetve kalciumtartalma szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest. Ugyanakkor a cink kezelésnek nem volt hatása az állatok réztartalmára, vastartalmára, valamint a kéntartalomra sem. A kapott eredmények alapján a növényi táplálkozású *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg faj jelentősen érzékenyebb a nano- mint a nagyszemcsés ZnO terhelésre. A *P. redivivus* esetén viszont a részecskeméret nem befolyásolta a ZnO mérgező hatása iránti érzékenységét. A két faj érzékenysége azonos mértékűnek tekinthető a vizsgálatban alkalmazott laboratóriumi körülmények között végzett, 25 nm-es méretű nano-ZnO kezelések esetén.



7. Summary

Nanotechnology encompasses practical knowledge on materials below size of 100 nm range and has grown into one of the fastest growing, most diverse areas in recent decades. Due to the fact that products containing nanoparticles have already been made available to consumers in numerous ways, their release into the environment is unavoidable and the rate of this process is increasing. However, the special features of the size, which make their application more widespread, can carry dangers as well. The amount of photocatalytically active ZnO nanoparticles is the largest among the nano-materials. ZnO nanoparticles are also applied in sunscreens and in other cosmetic products. The free-living nematodes are key members of soil fauna and soil food webs. Due to their biological and ecological attribution, free-living nematodes can be applied in ecotoxicology tests and they are suitable for field experiments, too. Nematodes in different feeding groups could react differently to xenobiotics. Different feeding groups of nematodes may react in different ways to potential contamination effects. Despite the varied life strategy and ecological functions of nematodes, data about the ecotoxicological effects of nanoparticles and other xenobiotics on nematodes have been derived almost only from tests on r-strategist bacterivorous rhabditid species, *Caenorhabditis elegans*.

In my doctoral research, two nematode species of different taxonomic position and life strategies were used as test organisms in order to investigate the ecotoxicological effect of ZnO particles and the element uptake. The ecotoxicity of nano-ZnO and the bulk counterpart was investigated using mortality tests in two free-living nematode species of different life strategies: *Xiphinema vuittenezi*, a K-strategist plant-feeder nematode and *Panagrellus redivivus*, an r-strategist bacterivorous one. The effects of the treatments on element content of the nematodes and zinc uptake were also investigated. The effects of commercially available nano- and bulk-ZnO were investigated and compared with the effects of ZnSO₄. In addition, the nano-ZnO (~25 nm) and bulk-ZnO (~221 nm) particles, prepared at the Department of Applied and Environmental Chemistry, University of Szeged, were investigated. *Xiphinema vuittenezi* nematodes were extracted from the soil using the modified Cobb's sieving method. Stock culture of *Panagrellus redivivus* was kept in a cereal-based substrate at the Department of Zoology and Animal Ecology, Szent István University. The toxicity tests and preparation of zinc uptake investigations were conducted on microtiter plates in Milli-Q water. Zinc and other micro- and trace elements as Ca, Cu, K, Fe, P, S were measured in each sample using TXRF spectrometry method. Based on the result of mortality tests, the effect of commercially available nano-ZnO and ZnSO₄ is similar. In contrast, the bulk-ZnO was less toxic to *Xiphinema vuittenezi*.



Concentration-dependent mortality in both nematode species was observed following a 24-h exposure to both prepared nano-ZnO and bulk ZnO. The zinc concentration of the treating suspension had a significant effect on the internal zinc content of the animals in both cases. Particle size had a significant effect on the toxicity of ZnO to *X. vuittenezi*. The 24-h LC₅₀ value was calculated as 1.63 mg Zn/l for nano-ZnO. The LC₅₀ value was determined as 57.77 mg Zn/l for the bulk ZnO. Particle size also had a significant effect on the toxicity to *P. redivivus*. The LC₅₀ values for nano-ZnO and bulk ZnO were found to be 3.34 mg/L and 2.38 mg/l Zn, respectively. The zinc content in the treated *X. vuittenezi* specimens was significantly higher at the concentration of 25 mg Zn/l as compared to the untreated nematodes. In case of *P. redivivus*, the zinc content in the treated animals was significantly higher from the concentration of 5 mg Zn/l onwards, as compared to the untreated nematodes both in the case of nano and bulk ZnO treatments. *P. redivivus* took up significantly more zinc than *X. vuittenezi*. The potassium and calcium content between the control groups of the two species was different. In case of the zinc treated *P. redivivus* nematodes, the potassium and the calcium content were significantly lower at each concentration as compared to that of the control animals. There were no significant differences between the treated and control nematodes in the case of the copper, iron and sulfur content. Based on our results, the plant-feeder *X. vuittenezi* is more sensitive to the nano-ZnO compared to bulk-ZnO. The sensitivity of the species was similar to the nano-ZnO (25 nm) in laboratory tests.



8. Irodalomjegyzék

- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A., Hull, M. (2006) Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup. Med.* 56:300-306. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql051>
- Amara, S., Slama, I.B., Omri, K., El Ghouli, J., El Mir, L., Rhouma, K.B., Abdelmelek H., Sakly M. (2012) Effects of nanoparticle zinc oxide on emotional behavior and trace elements homeostasis in rat brain. *Toxicol. Ind. Health* 31:1202-1209. <https://doi.org/10.1177/0748233713491802>
- Andrássy I. (1956) Die Rauminhalts- und Gewichtsbestimmung der Fadenwürmer (Nematoden), *Acta Zool. Hung.* 2 1–15.
- Andrássy I. (1990): Szabadon élő fonálféreg (Nematoda) a magyar faunában. *Állattani Közlemények* 76:17-38.
- Andrássy I. & Farkas K. (1988): Kertészeti növények fonálféreg kártevői. *Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*, 418 p.
- Annangi, B., Rubio, L., Alaraby, M., Bach, J., Marcos, R., Hernández, A., (2015) Acute and long-term in vitro effects of zinc oxide nanoparticles. *Arch. Toxicol.* 90:2201-2213. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1613-7>
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., Kahru, A., (2010) Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environ. Pollut.* 158:41-47. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.017>
- Bongers, T. (1990) The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83:14–19. <https://doi.org/10.1007/BF00324627>
- Bongers, T., Ferris, H. (1999) Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 14:224-228.
- Borm, P., Klaessig, F.C., Landry, T.D., Moudgil, B. et al (2006) Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol Sci* 90:23–32. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj084>
- Boyd, W.A., Williams, P.L. (2003) Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:2768-74. <https://doi.org/10.1897/02-573>
- Brown, D.J.F., Boag, B. (1988) An examination of methods used to extract virus-vector nematodes (Nematoda: Longidoridae and Trichodoridae) from soil samples. *Nematol. Mediterr.* 16:93-99.
- Bruinsma, J.J., Schneider, D.L., Davis, D.E., Kornfeld, K. (2008) Identification of Mutations in *Caenorhabditis elegans* that cause resistance to high levels of dietary zinc and analysis using a genomewide map of single nucleotide polymorphisms scored by pyrosequencing. *Genetics* 179:811–828.



<https://doi.org/10.1534/genetics.107.084384>

Bergmann, C.P. & Jung de Andrade, M. (2011) Nanostructured Materials for Engineering Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 173 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-19131-2>

Casals, E., Gonzalez, E., Puentes, V.F. (2012) Reactivity of inorganic nanoparticles in biological environments: insights into nanotoxicity mechanisms. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 45:443001
<https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/44/443001>

Cobb, N.A. (1915) Nematodes and their relationships. Index to the yearbooks of the United States Department of Agriculture. Wasgigton Department Printign Office (1922).

Crone, B., Aschner, M., Schwerdtle, T., Karst, U., Bornhorst, J. (2015) Elemental bioimaging of Cisplatin in *Caenorhabditis elegans* by LA-ICP-MS. *Metallomics* 7: 1189–1195.
<https://doi.org/10.1039/c5mt00096c>

De Jong, W.H., Borm, P.J.A. (2008) Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 3:133–149.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S596>

Drexler, E. (1987) Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology. ISBN:0-385-19973-2

Donkin, S.G., Dusenbery, D.B. (1993) A soil toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* and an effective method of recovery. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25:145-151.
<https://doi.org/10.1007/BF00212125>

Dumont, E., Johnson, A.C., Keller, V.D., Williams, R.J. (2015) Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters—Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution. *Environ. Pollut.* 196:341-349.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.022>

Evans, K., Trudgill, D.L., Webster, J.M. (1993) Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. CAB International, Wallingford, Oxon.

Fang-Yen, C., Avery L, Samuel, AD (2009) Two size-selective mechanisms specifically trap bacteria-sized food particles in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20093-20096.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904036106>

Fischer, P.W., Giroux, A., L'Abbé, M.R. (1981) The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am J Clin Nutr.* 34:1670-1675.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/34.9.1670>

Flegg, J. J. M. (1969) Tests with potential Nematode vectors of cherry leaf-roll virus. *Rep. E. Mallng Res. Stn. for 1968 D415.* 155–157.



Fujiwara, K., Suematsu, H., Kiyomiya, E., Aoki, M., Sato, M., Moritoki, N. (2008) Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. *Journal of Environmental Science and Health: Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 43: 1167-1173.
<https://doi.org/10.1080/10934520802171675>

González, M., Tapia, L., Alvarado, M., Tornero, J. D., Fernández, R. (1999) Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 14:885-888.
<https://doi.org/10.1039/A808748B>

Gupta, S., Kushwah, T., Vishwakarma, A., Yadad, S. (2015) Optimization of ZnO-NPs to investigate their safe application by assessing their effect on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nanoscale Res Lett*10:303.
<https://doi.org/10.1186/s11671-015-1010-4>

Györi D. (1984) A talaj termékenységé. *Mezőgazdasági Kiadó. Budapest*

Haight, M., Mudry, T., Pasternak, J. (1982) Toxicity of seven heavy metals on *Panagrell Us Silusiae*: the efficacy of the free-living nematode as an in vivo toxicological bioassay. *Nematologica* 28:3-11.
<https://doi.org/10.1163/187529282X00466>

Hägerbäumer, A., Höss, S., Heininger, P., Traunspurger, W. (2015) Experimental studies with nematodes in ecotoxicology: An overview. *J. Nematol.* 47:11-27.

Hechler, H. C. (1970): Reproduction, chromosome number, and postembryonic development of *Panagrellus redivivus* (Nematoda: Cephalobidae) *J. Nematol.* 2: 355-361.

Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71:1308–1316.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>

Honda, H. (1924). Resistance of Rhabditis to acids. *Biological Bulletin* 46:95–99.

Horváth B., Kovács Sz., Répási V., Márton A., Nagy P. (2010) Eltérő taxonómiai helyzetű növényi fonálférgek akut krómszennyezés iránti érzékenységének tesztelése. *Állattani Közlemények* 95: 47-55.

Höss, S. & Williams, P.L. (2009). Ecotoxicity testing with nematodes. In: Wilson, M.A. & Kakouli-Duarte, T. (eds): *Nematodes as Environmental Indicators*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA, pp. 208–224.
<http://dx.doi.org/10.1079/9781845933852.0208>

Höss, S., Reiff, N., Nguyen, H. T., Jehle, J. A., Hermes, H., and Traunspurger, W. (2014.) Small-scale microcosms to detect chemical induced changes in soil nematode communities—Effects of crystal proteins and Bt-maize plant material. *Sci Total Environ* 472:662–671.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.076>

Howell, R. (1982) Levels of heavy metal pollutants in two species of marine nematodes. *Mar Pollut. Bull.* 13:396-398.
[https://doi.org/10.1016/0025-326X\(83\)90170-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(83)90170-4)



Hu, C.W., Li, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen, J. Yang, L.Y. (2010) Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem* 42:586–591.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.007>

Huang, C.C., Aronstam, R.S., Chen, D.R., Huang, Y.W. (2010) Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol in Vitro* 24:45-55.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.007>

Hund-Rinke. K., Simon. M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13: 225-232.
<https://doi.org/10.1065/espr2006.06.311>

Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56–58.
<https://doi.org/10.1038/354056a0>.

ISO/TS 27687:2008 - Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.

ISO 10872:2010 Water quality—Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of Ecotoxicological Studies with Nematodes: *Caenorhabditis elegans* (Nematoda; International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jenser G., Simon I. (1980) A *Xiphinema vuittenezi* Luc, Lima, Weiscer, Flegg fitopatogenitásának vizsgálata gyümölcsfák gyökerén. *Növényvédelem*, 16:14–17.

Johnson, S.R., Ferris, J.M., Ferris, V.R. (1974) Nematode community structure of forest woodlots: III. Ordinations of taxonomic groups and biomass. *J Nematol* 6:118-126.

Kádár I. (2002) Levéltrágyázás jelentősége és szerepe a növénytáplálásban. *Agrofórum*. 13: 12. 7-10.

Kádár I. (2008) A mikroelem kutatások eredményeiről, különös tekintettel a Cu és Zn elemekre. *Acta Agronomica Óváriensis* 50: 11-13.

Kahru, A. & Dubourguier, H.C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269:105-119.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>

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.

Klockenkamper, R. (1997) Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Kool, P.L., Ortiz, M.D., van Gestel, C.A. (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>



Korthals, G.W., Bongers, T., Kammenga, J.E., Alexiev, A.D., Lexmond, T.M. (1996) Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:979-985.

<https://doi.org/10.1002/etc.5620150621>

Lacey, L. A., Georgis, R. (2012) Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *J. Nematol.* 44:218- 225.

Lau, K. Y. & M. Piah, M. A. (2011). Polymer Nanocomposites in High Voltage Electrical Insulation Perspective: A Review. *Malaysian Polymer Journal.* 6.

<https://doi.org/10.3390/polym8050173>

Leitgib, L., Kálmán, J., Gruiz, K. (2007) Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere* 66:428-434.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.024>

Li, M., Pokhrel, S., Jin, X., Madler, L., Damoiseaux, R., Hoek, E. M. V. (2011). 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>

Lovern, S., Strickler, J. R., Kapler, R. (2007). Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀, and C₆₀HxC₇₀Hx). *Environ. Sci. Technol.* 41: 4465-4470.

<https://doi.org/10.1021/es062146p>

Luc, M., Lima, M. B., Weischer, B., Flegg, J. J. M. (1964). *Xiphinema vuittenezi* n. sp. (Nematoda: Dorylaimidae). *Nematologica*, 10:151–163.

<https://doi.org/10.1163/187529264X00781>

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. Tox. Chem.* 28: 1324-1330.

<https://doi.org/10.1897/08-262.1>

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>

Ma, H., Kabengi, N. J., Bertsch, P. M., Unrine, 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>

Meyer, S. L., Halbrendt, J. M., Carta, L. K., Skantar, A. M. et al (2009) Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to plant-parasitic and bacterial-feeding nematodes. *J. Nematol.* 41:274-280.

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](https://doi.org/10.1002/etc.340)

Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T., Wu, C. M., Grassian, V. H. (2012) Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir* 28:396-403.

<https://doi.org/10.1021/la203542x>

Murphy, J. T., Bruinsma, J. J., Schneider, D. L., Collier, S. et al (2011) Histidine Protects Against Zinc and Nickel Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS. Genet.* 7:1002013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002013>

Nagy P. (1999) Effects of an artificial metal pollution on nematode assemblage of a calcareous loamy chernozem soil. *Plant and Soil* 212: 35-43.

<https://doi.org/10.1023/A:1004657924496>

Nagy P, Bakonyi G, Bongers T, Kádár I, Fábrián M, Kiss I (2004) Effects of microelements on soil nematode assemblages seven years after contaminating an agricultural field. *Sci Total Environ* 320:131-143.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.08.006>

Nagy P. (2009) Case studies using nematode assemblage analysis in terrestrial habitats. In: Wilson, M. J., Kakouli-Duarte, TH. (eds): *Nematodes as Environmental Indicators*, CABI, 172-187.

Novillo, A., Won, S. J., Li, C., Callard, I. P. (2005). Changes in nuclear receptor and vitellogenin gene expression in response to steroids and heavy metal in *Caenorhabditis elegans*. *Integr Comp Biol* 45:61–71.

<https://doi.org/10.1093/icb/45.1.61>

Osán J., Kurunczi S., Török S., Varga I. (2006) Röntgenfluoreszcens spektrometria. In: G. Zárny (eds): *Az elemanalitika korszerű módszerei*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 353-416.

Pándics T (2008) A nanorészecskék környezetegészségügyi hatásainak elemzése. *Egészségtudomány* 52: 6-25.

Péntek A., Fazekas Cs. (2016) A cink hiányának kiváltó okai a talaj-növény rendszerben. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 20: 48-61.

Polak, N., Read, D.S., Jurkschat, K., Matzke, M., Kelly, F.J. et al (2014) Metalloproteins and phytochelatase synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 160:75–85.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.12.001>

Radoslavov, G., Jordanova, R., Teofanova, D., Georgieva, K., Hristov, P., Salomone-Stagni, M., Liebau, E., Bankov, I. (2010) A Novel Secretory Poly-Cysteine and Histidine-Tailed Metalloprotein (Ts-PCHTP) from *Trichinella spiralis* (Nematoda). *PLoS ONE*, 5:13343.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013343>

R Development Core Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.



Reed, R.B., Ladner, D.A., Higgins, C.P., Westerhoff, P., Ranville, J.F. (2012) Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environ. Toxicol. Chem.* 31:93-99.

<https://doi.org/10.1002/etc.708>

Répási V., Nagy P., Coiro M.I., Agostinelli A., Lamberti F. (2006) A Magyarországon előforduló tífónálféreg (*Nematoda, Xiphinema*) fajok elterjedési viszonyainak áttekintése, újabb vizsgálatok alapján. *Növényvédelem*, 42: 655-661.

Ricci, M., Fifi, A.P., Ragni, A., Schlechtriem, C., Focken, U. (2003) Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:556-9.

<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1178-2>

Roh, J., Park, Y., Park, K., Choi, J. (2010): Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29: 167-172.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.003>

Samoiloff, M. R. & Pasternak, J. (1969) Nematode morphogenesis: fine structure of the molting cycles in *P. silusiae*, *Can. J. Zool.* 47:639-643.

Samoiloff, M.R., Shulz, S., Jordan, Y., Denich, K., Arnott, E. (1980) A Rapid Simple Long-Term Toxicity Assay for Aquatic Contaminants Using the Nematode *Panagrellus redivivus*. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 37:1167-1174.

<https://doi.org/10.1139/f80-149>

Sávoly Z (2010) Totálreflexiós röntgenfluoreszcencia spektrometria. *Fizikai szemle* 3:79-82.

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>

Sávoly Z, Nagy P, Varga G, Havancsák K, Hrács K, Záray GY (2013) A novel method for investigation of uptake and distribution of polluting microelements and nanoparticles in soil-inhabiting nematodes. *Microchem. J.* 110:558-567.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.07.007>

Sávoly Z (2013) Talajszennyező mikroelemek felvételének, eloszlásának és speciációjának vizsgálata fonálféregekben mikroanalitikai módszerekkel, Doktori értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémia Doktori Iskola Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia doktori program. Budapest.

Sávoly Z, Buzanich, G., Pepponi, G., Strelci, C. et al (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., Strelci, C., Záray Gy, Nagy P I (2016) Uptake and toxicity of nano-ZnO in the plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*: the role of dissolved zinc and nanoparticle-nature. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:9669-9678.

<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5983-4>



Scholz-Starke, B., Beylich, A., Moser, T., Nikolakis, A., Rumpler, N., Schäffer, A., Theißen, B., Toschki, A., and Roß-Nickoll, M. (2013) The response of soil organism communities to the application of the insecticide lindane in terrestrial model ecosystems. *Ecotoxicology* 22:339–62.

<https://doi.org/10.1007/s10646-012-1030-0>

Serpone, N., Dondi, D., Albin, A. (2007) Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica. Chim. Acta* 360:794-802.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>

Sloup, V., Jankovská, I., Nechybová, S., Peřinková, P., Langrova, I. (2017) Zinc in the Animal Organism: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 48: 13-21.

<https://doi.org/10.1515/sab-2017-0003>

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>

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>

Stefanovits P (1977) Talajvédelem, környezetvédelem. Mezőgazdasági Kiadó 244 p.

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B. (2014) Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.* 185:69-76.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>

ToxRat Professional (2010)- Software for Ecotoxicity Response Analysis. Alsdorf, Germany: Version 2.10.05 ToxRat® Solutions GmbH

Truhaut, R. (1977) Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1: 151-173.

[https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1)

UNESCO (2015) UNESCO Science Report: Towards 2030. United Nations Education, Scientific & Cultural Organization, Paris, France

Yeates, G. W., Bongers, T., Degoede, R. G. M., 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.

Yoneda, Y. & Horiuchi, T. (1971) Optical Flats for Use in X-Ray Spectrochemical Microanalysis. *Rev. Sci. Instrum.* 42:169-70.

<https://doi.org/10.1063/1.1685282>



Van der Wurff, A. W. G., Kools, S. A. E., Boivin, M. E. Y., Van den Brink, P. J., Van Megen, H. H. M., Riksen, J. A. G., Doroszuk, A., Kammenga, J. E. (2007). Type of disturbance and ecological history determine structural stability. *Ecol Appl* 17:190–202.
[https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2007\)0172.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2007)0172.0.CO;2)

Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K. A., Van der Meeren, P., Lucas, S., Janssen, C. R. (2008) Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: importance of surface area. *Environ. Tox. Chem.* 27:1948-1957.

Van Gestel, C. A. M., Kool, P.L., Ortiz, M. D. (2010) Metal-based nanoparticles in soil: New research themes should not ignore old rules and theories. Comments on the paper by Hu et al. (2010) 'Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*.' *Soil Biology. & Biochemistry* 42, 586-591. *Soil Biology & Biochem* 42: 1892-1893.

Vinila, V. S., Jacob, R., Mony, A., Nair, H. G. et al. (2014) X-Ray Diffraction analysis of nano crystalline ceramic PbBaTiO₃. *Crystal. Struct. Theory. and Appl.* 3:9.
<https://doi.org/10.4236/csta.2014.33007>

Wang, Z. L. (2004) Zinc oxide nanostructures: growth, properties and application. *J. Phys.: Condens Matter* 16:829-858.
<http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/16/25/R01>

Wang, H., Wick, R. L., Xing, B. (2009) Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Pollut.* 4:1171-1177.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.004>

Winkler, E. J., Pramer, D. (1961): A Chamber for culturing and collecting the Nematode *Panagrellus redivivus*. *Nature* 192, 472–473.

Wu, Q., Nouara, A., Li, Y., Zhang, M., Wang, W. et al (2013) Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 90:1123-1131.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.019>

Zullini, A. (1976) Nematodes as indicators of river pollution. *Nematol. Medit.* 4:13-22.



Internetes hivatkozások jegyzéke

http 1: <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0900006.kvv>

Kereső program: Google. Kulcsszavak: 6/2009, rendelet, földtani közeg.
(2019. 05. 29. 10:50)

http 2: <https://www.britannica.com/science/zincite#/media/1/657376/117445>

Kereső program: Google. Kulcsszó: zincite.
(2020. 01. 02. 16:59)

http 3: <https://echa.europa.eu/hu/regulations/nanomaterials>

Kereső program: Google. Kulcsszavak: echa, nanomaterials.
(2019. 04. 27 19:38)

http 4:

<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:HU:PDF>

Kereső program: Google. Kulcsszavak: eurlex; nano.
(2019. 05. 30. 10:07)



9. Köszönetnyilvánítás

Azért, hogy idáig eljutottam rengeteg embernek tartozom köszönettel, akik támogattak doktori kutatásom és a dolgozat megszületése során. Elsősorban szeretném megköszönni a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék minden munkatársának és hallgatójának a segítséget és a doktori éveim alatt együtt töltött időt, hiszen nem csak szakmailag, hanem emberileg is rengeteget tanultam tőlük. Szeretném elsőnek Dr. Bakonyi Gábornak megköszönni, mert ő volt a diplomamunkám témavezetője, emellett szeretném megköszönni, hogy bátorított az Erasmus tanulmányaim során is, valamint végig számíthattam szakmai támogatására a doktori munkám során.

Mérhetetlen köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Péternek, aki mindvégig maximálisan támogatott mind szakmailag, mind emberileg az együtt töltött idő alatt. Állattan, illetve nematológia területén hatalmas tudással rendelkezik melyet nagyon nagy odaadással ad át, nagyon sokat tanultam tőle közös munkám során

A munkám nem lehetne teljes, Dr. Sávolgy Zoltán támogatása nélkül, szakértelme nélkül és az általa elvégzett analitikai mérések nélkül. Köszönettel tartozom Dr. Kukovecz Ákosnak és Dr. Papp Ibolya Zitának az előállított cink-oxid részecskékért, illetve a felmerült kérdések során nyújtott szakmai segítségért. Szeretném továbbá megköszönni Dr. Seres Anikónak, egyben egykori szobatársamnak a szakmai segítséget, melyet doktori munkám és oktatói tevékenységem során kaptam. Illetve, Surman Ildikónak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségért.

Nem lehetek elég hálás szüleimnek, Kun Ilonának és Hrács Józsefnek, hogy mind egyetemi tanulmányaim során, mind doktori munkám során maximálisan támogattak. Testvéremnek Hrács Dorottyának, hogy támogatott és türelemmel viselte ezt az időszakot. Valamint nagymamáimnak, Hrács Józsefnének és Kun Györgynének érdeklődésükért és támogatásukért. Szeretett nagypapáim, Hrács József és Kun György is mellettem lettek volna, de sajnos nem élhették meg ezt az időszakot.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani férjem szüleinek, Heinrich Ibolyának és Weisz Péternek a támogatásukért.

Külön köszönettel tartozom Kovács Tímea barátnőmnek, aki segített a grafikai elemek elkészítésben.

Disszertációm megszületését leginkább páromnak, Weisz Máténak köszönhetem, aki mindvégig türelemmel volt munkám során és maximálisan támogatott. Hálás vagyok, hogy munkám jelentős része során már velem volt Szotyí kutyám, akinek vidámsága átsegített a nehezebb időszakokon is.

