

PANNON EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYTERMESZTÉSI ÉS KERTÉSZETI TUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA

Doktori iskola vezető: Dr Kocsis László

Konzulens:

Dr. Taller János

Fenoxi-alkán-karbonsav növényvédő szerek és keverékeik citotoxikus és mutagén hatásai

DOI: 10.18136/PE.2014.550

Készítette:

Bokán Katalin

Keszthely

2014.

Fenoxi-alkán-karbonsav növényvédő szerek és keverékeik citotoxikus és mutagén hatásai

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta: Bokán Katalin

Készült a Pannon Egyetem Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

Doktori Iskolájának keretében

Konzulens: Dr. Taller János

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

A jelölt a doktori szigorlaton..... % -ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló
neve: igen /nem
aláírás

Bíráló
neve: igen /nem
aláírás

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el.

Készthely,.....

.....
A Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése:.....

Tartalom

KIVONATOK	6
Magyar nyelvű kivonat	6
Summary	7
Zusammenfassung	8
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. Fenoxi-ecetsav és -propionsav típusú gyomirtó szerek és hatóanyagaik (2,4-D, MCPA, diklórprop és mekoprop).....	11
2.1.1. Fenoxi-alkán-karbonsav típusú gyomirtó szer hatóanyagok bioakkumulációs-biodegradációs tulajdonságai	14
2.1.2. Fenoxi-alkán-karbonsav típusú gyomirtó szer hatóanyagok toxicitása	16
2.1.2.1. Toxicitásuk mikroorganizmusokon.....	16
2.1.2.2. Toxicitásuk vízi szervezeteken	16
2.1.2.3. Toxicitásuk szárazföldi szervezeteken	17
2.1.2.4. Humán toxikológiájuk.....	18
2.1.3. Fenoxi-alkán-karbonsav típusú gyomirtó szer hatóanyagok mutagenitása	20
2.2. Mutagenitási és toxicitási tesztek áttekintése	22
2.2.1. Egysejtűeken végzett tesztek.....	22
2.2.2. Növényi tesztek	23
2.2.3. Állatokkal végzett tesztek	25
2.2.3.1. Gerinctelenek.....	25
2.2.3.2. Gerincesek – <i>in vitro</i>	25
2.2.3.3. Gerincesek – <i>in vivo</i>	29
2.3. Sejttenyészetek kezelése	30
2.4. Komplex vegyületek kockázatbecslése	31
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	33
3.1. A vizsgált anyagok	33
3.2. Talajminták kezelése és a mintavételezés módszere	33
3.2.1. Üvegházi tenyészedényes vizsgálatok	33
3.2.2. Szabadföldi vizsgálatok	35
3.2.3. A talajminták előkészítése.....	36
3.3. Az alkalmazott mutagenitási tesztek módszerei.....	37
3.3.1. <i>Allium cepa</i> teszt (cito- és genotoxicitás vizsgálat)	37
3.3.1.1. Az effektív koncentráció (EC) meghatározása	37
3.3.1.2. Kromoszóma aberrációs teszt	39
3.3.1.3. Az alkalmazott statisztika	40
3.3.2. MTT teszt	41
3.3.2.1. Halsejtek kezelése.....	41
3.3.2.2. MTT teszt kivitelezése	42
3.3.2.3. Alkalmazott statisztika	42
3.3.3. EPC comet teszt.....	43
3.3.3.1. Sejtvonala és a sejtek kezelése	43
3.3.3.2. Comet teszt	45

3.3.3.3. Az alkalmazott statisztika.....	47
4. EREDMÉNYEK.....	48
4.1. Az <i>Allium cepa</i> teszt vizsgálatainak eredményei	48
4.1.1. EC ₅₀ érték meghatározása az <i>Allium cepa</i> tesztben	48
4.1.2. Morfológiai elváltozások vizsgálata az <i>Allium cepa</i> tesztben	50
4.1.3. Mutációs hatások meghatározása az <i>Allium cepa</i> tesztben	51
4.1.3.1. Fenoxi herbicidek és hatóanyagaik mutagén hatásának vizsgálata az <i>Allium cepa</i> tesztben.....	51
4.1.3.2. Talajextraktumok mutagén hatásának vizsgálata az <i>Allium cepa</i> tesztben.....	57
4.2. Az MTT teszt vizsgálatainak eredményei.....	58
4.3. A comet teszt vizsgálatainak eredményei	61
4.3.1. A comet teszt optimalizálása EPC halsejteken.....	61
4.3.1.1. Az expozíciós idő hatásának vizsgálata	61
4.3.1.2. A megfelelő tenyészedény kiválasztása	62
4.3.1.3. A megfelelő tápoldat kiválasztása	63
4.3.1.4. A tripszin használatának hatása	64
4.3.2. Fenoxi herbicidek és hatóanyagaik vizsgálata a comet tesztben	65
4.3.3. Talajextraktumok vizsgálata a comet tesztben	66
4.3.3.1. Üvegházi tenyészedényes kísérletből származó talajextraktumok vizsgálata ...	66
4.3.3.2. Szabadföldi kísérletből származó talajextraktumok vizsgálata	67
5. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	69
5.1. A fenoxi-karbonsav típusú növényvédő szerek és hatóanyagaik toxikus hatásával kapcsolatos vizsgálatok	69
5.2. A fenoxi-karbonsav típusú növényvédő szerek és hatóanyagaik genotoxikus hatásával kapcsolatos vizsgálatok	70
5.3. A fenoxi-alkán-karbonsav típusú növényvédő szerrel kezelt talajkivonatok mutagenitásával kapcsolatos vizsgálatok	73
5.4. Az EPC comet teszt optimalizálásával kapcsolatos eredmények	75
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	79
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	82
NEW SCIENTIFIC RESULTS	83
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
IRODALOMJEGYZÉK.....	85
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	97
MELLÉKLET.....	98

KIVONATOK

Magyar nyelvű kivonat

Fenoxi-alkán-karbonsav növényvédő szerek és keverékeik citotoxikus és mutagén hatásai

A disszertáció két, általánosan alkalmazott fenoxi-alkán-karbonsav herbicid, az Optica trió és a Dezormon, valamint aktív hatóanyagaik (4-kloro-*o*-toliloxiecetsav, 2,4-diklórfenoxi-ecetsav, 2-(4-kloro-2-metilfenoxi)propionsav, 2-(2,4-diklórfenoxi)propionsav) toxikus és mutagén hatásait vizsgálja egyedileg és keverékben. Ezt kiegészítendő, három eltérő típusú (tőzeges virágföld, szolonyeces réti talaj, humuszos homoktalaj), növényvédő szerekkel kezelt talaj extraktumai is vizsgálatra kerültek a bennük fellelhető szermaradékok esetleges genotoxikus hatását felmérendő. Három bioteszt került kiválasztásra, melyek különböző toxikológiai és genetikai végpontokat voltak hivatottak vizsgálni.

Az MTT teszt alkalmazása során a 2,4-D, MCPA és a diklórprop nem okozott citotoxikus hatást ponty epithelialis halsejteken, ugyanakkor mekoprop esetében 1-1000 mg/l-es dózisban szignifikáns citotoxikus hatás volt mérhető.

Az *Allium cepa* teszt segítségével megállapításra kerültek a vizsgált készítmények és hatóanyagaik effektív koncentrációi egyedileg és keverékben. Valamennyi vizsgált vegyület teljes növekedés-gátlást okozott nagy koncentrációban, az effektív koncentrációk tekintetében pedig szinergisztikus hatások voltak megfigyelhetőek a bináris és ternáris keverékek esetében is, valamint a mitotikus index dózifüggő csökkenése. A kromoszóma aberrációk számának szignifikáns növekedése egyedül az MCPA, mekoprop és diklórprop ternáris keverékének esetében jelentkezett, feltételezhetően szinergisztikus hatások eredményeként.

A 2,4-D és az MCPA hatóanyagok kromozómatöréses mutációt okoztak EPC comet tesztben már 100 mg/l-es dózisban, míg a növényvédő szerek csak nagy dózisban voltak enyhén genotoxikus hatásúak. Az EPC comet teszt számos paramétere, így az inkubációs idő hossza, a tenyészedény, a tenyész médium összetétele és a tripszin felhasználásának hatása is vizsgálatra került. Kimutatható volt, hogy a tripszin használatának elkerülése a kezelések során szignifikánsan csökkenti a károsodott DNS mértékét a kezeletlen kontrollban.

Summary

Cytotoxic and mutagenic effects of phenoxyalkanoic acid herbicides, active ingredients and their mixtures

The cytotoxic and mutagenic effects of two commonly used herbicides (Dezormon and Optica trió) and their four active ingredients (4-Chloro-*o*-tolylxyacetic acid, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2-(4-Chloro-2-methylphenoxy)propionic acid, 2-(2,4-Dichlorophenoxy)propionic acid) were studied individually and in a mixture. In addition the potential mutagenic effects of detectable phenoxyacetic acid pesticide residues in soil extracts of different soils (peat potting soil, meadow soil, mouldy sandy soil) were analyzed. Three biotests were chosen representing different biological systems, toxicological and genetical endpoints.

When tested by means of MTT assay, the obtained results showed no cytotoxic effect in case of 2,4-D, MCPA and dichlorprop on any of the applied doses on a carp epithelial cell line. In contrary examining mecoprop significant effect was detectable when 1-1000 mg/l was applied.

By the means of *Allium cepa* test the effective concentration of examined pesticides and their active ingredients' were determined. All the examined chemicals were capable to inhibit root growth on higher concentrations and dose-dependent decrease of the mitotic index was observable. None of them caused significant chromosome aberrations except MCPA, mecoprop and dichlorprop in a ternary mixture which may be result of synergistic effects.

In the comet test it was found that among the active ingredients 2,4-D and MCPA causes DNA strand breaks on 100 mg/l, while both herbicides were slightly mutagenic only in high concentrations. Furthermore different test parameters on EPC comet test were examined and it was found that avoiding trypsin during the treatment of the cells decreased the damage of cells and thus improved the negative controls with significantly lower DNA damage.

Zusammenfassung

Drei verschiedene Testsystemstudien zu mutagenetischen Effekten bei phenoxyazetischen Herbiziden und ihren aktiven Inhaltstoffen

Die folgende Doktorarbeit enthält Studien zu mutagenetischen Effekten bezüglich zweier geläufiger Herbizide, „Dezormon“ und „Optica Trió“, und ihren aktiven Inhaltsstoffen ((4-Chloro-*o*-tolylxyazetische Säure, 2,4-Dichlorphenoxyazetische Säure, 2-(4-Chloro-2-methylphenoxy-) propionische Säure und 2-(2,4-Dichlorphenoxy-) propionische Säure) einzeln, als auch in Mischungen. Des Weiteren wurden potenzielle mutagenetische Effekte zu messbaren phenoxyazetischen Pestizidresiduen in Bodenfiltraten zu verschiedenen Bodentypen (Sand, Löss und braune Walderde) analysiert. Drei mutagenetische Tests wurden nach biosystematischen und genetischen Gesichtspunkten ausgewählt.

Bei der Anwendung des MTT- Test hat das 2,4-D, MCPA und Dichlorprop keine Zytotoxizität verursacht, für die Mecoprop bei Konzentrationen von 1-1000 mg/l führte zu einem signifikanten Effekt.

Beim *Allium cepa* - Test wurden die Effektivkonzentrationen der jeweilig untersuchten Pestizide und ihrer aktiven Inhaltstoffe bestimmt. Alle untersuchten Chemikalien konnten den Wurzelwachstum in höheren Konzentrationen hemmen. Ein dosierungsabhängiger Rückgang wurde im mitotischen Index beobachtet. Keines der Chemikalien führte zu signifikanten Chromosomaberrationen, ausser MCPA, mecoprop und dichlorprop in einer Dreifachmischung, was das Resultat synergistischer Effekte sein könnte.

Im comet Test stellte sich heraus, dass 2,4-D und MCPA bei Konzentrationen von 100 mg/l sogenannte DNA-Strangbrüche verursachte. Letztere Herbizide verursachten mutagenetische Effekte nur bei hohen Konzentrationen. Wenn die Zugabe von Trypsin während der Zellbehandlungen ausgelassen wurde, führte dies zu einer erhöhten Zellschädigung, wodurch die negativen Kontrollen mit signifikant geringeren DNA Schäden aufgewertet wurden.

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Modern életünk elképzelhetetlen lenne a mesterségesen előállított vegyületek, kemikáliák nélkül. Az elmúlt idők során azonban számos, kezdetben egyértelműen hasznosnak ítélt vegyületről derült ki később, milyen súlyos környezetkárosító tulajdonságokkal bír. Ilyen, mindenki által ismert történet a DDT-é például, melynek igen súlyos mellékhatásairól a közvélemény Rachel Carson 1962-ben kiadott, a *Néma tavasz* című könyvéből tájékozódhatott (Carson, 1962).

A növényvédelem során felhasznált anyagok, így a növényvédő szerek is hosszabb-rövidebb ideig a környezetünkben maradnak, bekerülnek a talajba, vizeinkbe, kölcsönhatásba léphetnek az ott élő szervezetekkel, feldúsulhatnak, kumulálódhatnak a táplálékláncban (Arnold és Beasley, 1989; Houk, 1992; Venkov és mtsai, 2000). Bizonyított, hogy a rákos megbetegedések közel 80%-át a környezetünket szennyező mutagének okozzák (Ibrahim és mtsai, 1991). Magyarországon közelítőleg 300 ezer fő szenved daganatos megbetegedésben („Nemzeti Rákellenes Program,” 2006), ezért a környezetbe juttatott vegyszerek, így a növényvédő szerek toxicitásának és mutagenitásának vizsgálata is elengedhetetlenül fontos feladatunk.

A hazai talajokban a DDT és az atrazin mellett az auxin hatású 2,4-D a harmadik leggyakoribb növényvédő szer maradék, a vizsgált talajok mintegy 20%-ában volt kimutatható (Maloschik és mtsai, 2007). A szintén ebbe a csoportba tartozó MCPA, mekoprop és diklórprop is gyakran előforduló szermaradékok a talajban (Károly és mtsai, 2001).

Bár a Magyarországon jelenleg felhasználható növényvédő szereket, így a fenoxi-alkán-karbonsav herbicideket is számos toxicitási és mutációs tesztben vizsgálták már, a talajba, mint komplex mátrixba kerülve a készítmények viselkedése eltérhet a tiszta hatóanyagok vizsgálatokor tapasztalt viselkedésétől (White és Claxton, 2004; Nortcliff és mtsai, 2006).

Kutatásaim során növényvédő szerek monitorozását végeztem, valamint talajextraktumokban kimutatható növényvédő szermaradékok esetleges toxikus és mutagén hatásait vizsgáltam MTT, *Allium cepa* és comet tesztek alkalmazásával. A vizsgálatokhoz olyan tesztekkel igyekeztem választani, melyek nemzetközi viszonylatban elterjedtek, elfogadottak a környezeti minták analizálására, ugyanakkor

gyors választ adnak, alacsony eszközigényűek és könnyen meghonosíthatóak az ökotoxikológiai rutinvizsgálatok elemeiként (Zeiger, 2010; Mahadevan és mtsai, 2011). Hazánkban a comet tesztet napjainkban jellemzően csak mikrobiológiai, orvosi kutatásokban alkalmazzák (Sinkó és mtsai, 2005; Zana és mtsai, 2006; Koreck és mtsai, 2007), az MTT és *Allium cepa* teszt pedig igen ritkán alkalmazott, pedig számos előnyös tulajdonságuk indokolja felhasználásukat környezetanalitikai, ökotoxikológiai célokra.

Az *Allium cepa* teszttel aneuploidizmus és kromoszóma aberrációk mutathatóak ki (Fiskesjő, 1985). A ponty epitheliumából származó sejtvonalon alkalmazott MTT és comet tesztek közül az utóbbi segítségével egy-, illetve kétszálú kromoszómatoréseket vizsgálhatóak (Singh és mtsai, 1988), míg az MTT teszt citotoxicitás mérésére alkalmas (Mosmann 1983, Gerlier és Thomasset 1986). Így a három teszt során alkalmazott célszervezetek együttesen reprezentálják az élővilág több csoportját (növények, többsejtű állatok), illetve különböző mutációs és toxicitási mechanizmusok vizsgálhatóak alkalmazásukkal.

Munkám során célul tűztem ki:

-A világszerte, így Magyarországon is elterjedt fenoxi-alkán-karbonsav herbicid növényvédő szerek revízióját, citotoxikus és mutagén hatásaik vizsgálatát.

-A hatóanyagok együttes hatásának kockázatbecslését, a vegyületek keverékei által okozott citotoxikus és mutagén hatások vizsgálatát.

-A vizsgálatokhoz olyan toxicitási és mutagenitási tesztek kiválasztását, amelyek alkalmazása megfelel a nemzetközi gyakorlatnak, alkalmazásuk gyors, egyszerű, és relatív olcsó, így Magyarországon is elterjedhetnek az ökotoxikológiai vizsgálatok során.

-A tesztekhez eltérő testszervezetek kiválasztását, hogy a kapott eredmények extrapolálhatósága vizsgálhatóvá váljon az eltérő célszervezetek között.

-Az auxin hatású növényvédő szerek és aktív hatóanyagaik vizsgálatán túl ezek mutagén hatásának felmérését a talajba, mint komplex mátrixba kerülve.

-Az EPC comet teszt optimalizálását, a teszt során alkalmazott paraméterek pontos vizsgálatát, a legmegfelelőbb tesztkörülmények megválasztását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Fenoxi-ecetsav és -propionsav típusú gyomirtó szerek és hatóanyagaik (2,4-D, MCPA, diklórprop és mekoprop)

A peszticideket hatásspektrumuk alapján három nagy csoportba sorolhatjuk, ezek a gombaölők (fungicidek), a állatirtó szerek (zoocidek), és a gyomirtók (herbicidek). Ezek közül a herbicidek azok, melyek célcsoportja –a gyomnövények-élettanilag a legközelebb áll a védendő fajokhoz. Így a hatásuk akkor lesz kellőképpen eredményes és szelektív, ha a kártevőcsoport egy-egy speciális élettani folyamatát alapul véve célzottan csak azokat irtják a felhasznált szerek (Cobb és Reade, 2010).

A herbicidek csoportjába tartoznak az auxin hatású herbicidek, melyeket világszerte széles körben használnak napjainkban gyomnövények irtására. A fenoxi-ecetsav herbicidek legfőbb képviselői a 2,4-D és az MCPA, míg a fenoxi-propionsav herbicidek közül a mekoprop (MCP) és a diklórprop (2,4-DP) a legismertebbek.

A karbonsavak és savszármazék növényvédő szerek a kétszikű gyomokat szelektíven irtó hatóanyagok, melyek kisebb mennyiségben a természetes auxinhoz hasonlóan serkentik a növekedést, ezért hormon-típusú vagy auxin hatású herbicideknek is nevezzük őket. A 2,4-D például kis mennyiségben (10^{-8} mol) elősegíti a növényzet növekedését, nagyobb mennyiségben (10^{-4} mol) viszont defoliáns növényzetpusztító hatású (Bronsema és mtsai, 1998; Kitamiya és mtsai, 2000).

Az auxinok többnyire indolvázis növényi hormonok, melyek a sejtnagyobbodást, így a megnyúlásos növekedést serkentik. Ez több hatás együttes eredőjeként jön létre: az auxinok fokozzák a sejtfalak plaszticitását, illetve az ozmotikusan felvehető anyagok felvételét. Ennek eredményeként fokozódik a sejt vízfelvétele, nő a turgornyomás, a plasztikus falú sejt így megnagyobbodik. Ezen túl fokozódik a sejtben a nukleinsav- és fehérjeszintézis is (Cobb és Reade, 2010). A szintetikus auxin származékok pontos biokémiai hatásmechanizmusa nem ismert, de tudjuk, hogy a sejtosztódást és a megnyúlásos növekedést serkentik. A megnövekedett metabolikus folyamatok kimerítik a növény tartalékait, felborul az energiaforgalma. A növekedés koordinálatlanná válik, a hajtások torzok, törékenyek lesznek, miközben az erős növekedésben lévő gyom jobban károsodik. A szintetikus auxinok által

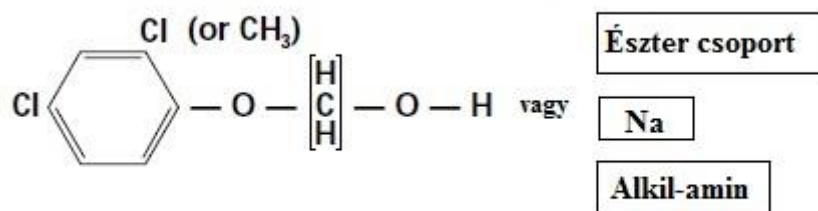
leggyakrabban kiváltott rendellenességek az epinasztia, a szárok és gyökerek növekedésgátlása, valamint a levelek erőteljes pigmentációja. Ezen jelenségek kísérőjeként a sztómák korlátozott nyílása, a lombozat fokozott előregedése, a membránok és vaszkuláris rendszer integritásának károsodása, kiszáradás és lokalizált sejthalál is megfigyelhető (Grossmann, 2000; Mccarthy és mtsai, 2004). A fenoxi-karbonsav herbicidek mechanizmusának molekuláris hátterében az auxin-citokinin hormonális rendszer egyensúlyának felbomlása áll (Bukowska, 2006).

A természetes auxin a sejt plazmamembránjához kapcsolódva hírvivő faktorokat indukál, melyek a citoplazmából a sejtmagba jutva változásokat idéznek elő a fehérjeszintézisben. Az auxin hatású fenoxi-ecetsavak is hasonló membrán hatásokat képesek kiváltani, azonban az indukált transzkripció természetellenes módon fennmarad.

A természetes auxinok és az auxin hatású herbicidek a sejtmembránon található auxin receptorhoz csatlakozhatnak, melyek az aromás gyűrűvel, az ionos karboxilcsoporttal vagy a gyűrűhöz képest α helyzetű szénatommal léphetnek kölcsönhatásba (Kidd és James, 1991).

Az auxin hatású herbicidek egyaránt felszívódnak a gyökéren és a levélen át is, és a szállítócsöveken keresztül terjednek. A készítmények jobban hatnak a növények erőteljes asszimilációs időszakában, ez az egyik oka szelektivitásuknak: a gabonafélék a bokrosodási időszakban erőteljesen csökkentik a növekedés ütemét, így a kipermetezett szerek csak a kétszikű gyomokra hatnak. Szintén ezért napos időben a készítmények gyomirtó hatása hamarabb bekövetkezik (Nechay és Pap, 1962; Terényi és mtsai, 1967).

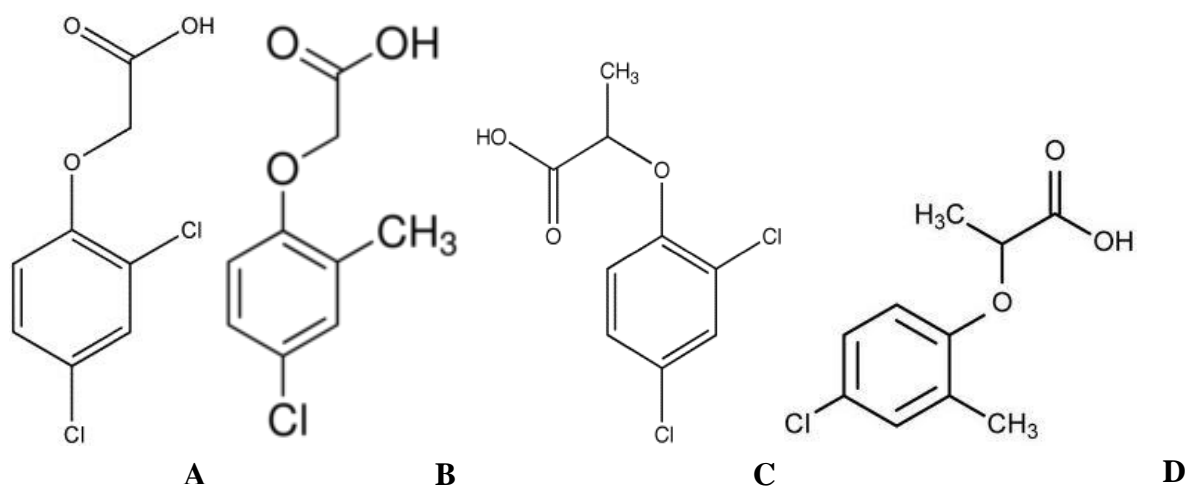
A fenoxi herbicideket szelektív gyomirtó hatásuk miatt régóta felhasználják nem csak kalászosokban, de parkokban, golfpályákon, ligetekben, sétányokon és parkokban is (Charles és mtsai, 1999a). A készítményeket egyaránt alkalmazhatják pre-, illetve posztemergensen, azaz kelés előtt vagy kelés után (Kidd és James, 1991).



1. ábra: A fenoxi-karbonsav herbicidek általános szerkezeti képlete

A fenoxi-ecet és -propionsavak közös szerkezeti jellemzője az alifás karbonsavhoz csatlakozó klórszubsztituált fenoxicsoport (1. ábra). Az alifás karbonsavak rendszerint ecetsav, propionsav vagy vajsav. A gyakorlatban vízoldható sóik vagy észterek alakjában kerülnek forgalomba. Legáltalánosabban elterjedtek a fenoxi-ecetsavak (2,4,5-T, 2,4-D, MCPA, 2. ábra). A legtöbb hatóanyag saját aktivitással rendelkezik, míg néhány az aktív hatóanyag prekuzora, melyből még felvétel előtt a talajban vagy a növényi szövetekben képződik aktív vegyület, ilyen pl. az MCPB (Nechay és Pap, 1962; Terényi és mtsai, 1967).

Magyarországon a 2013-as rendelkezések szerint 5 auxin hatású növényvédő szer hatóanyag van forgalomban, ezek a 2,4-D, az MCPA, MCPB, a diklórprop-P és mekoprop-P. Ezek a készítményekben előfordulhatnak egyedüli összetevőként (pl.: Dezormonban csak 2,4-D található), vagy egyéb hatóanyagokkal együtt (pl.: a Callamban a dikamba mellett tritoszulforon is van), így módosított hatást érve el (Ocskó és mtsai, 2013). A 2013-ban engedélyezett, auxin hatású készítmények listáját és főbb felhasználási területüket a melléklet 5. táblázatában tüntettem fel.



2. ábra: Fenoxi-karbonsav herbicid hatóanyagok szerkezeti képlete. **A**- 2,4-D; **B**- MCPA; **C**- diklórprop; **D**- mekoprop

2.1.1. Fenoxi-alkán-karbonsav típusú gyomirtó szer hatóanyagok bioakkumulációs-biodegradációs tulajdonságai

A környezetbe csak kis mennyiségben bekerülő toxikus anyagokat (peszticidek, szerves oldószerek, poliklórozott bifenilek, policiklikus aromás szénhidrogének stb.) összefoglalóan szerves mikroszennyezőknek nevezik. A talaj szilárd, folyékony és gázfázisa közötti megoszlásukat és további sorsukat alapvetően a szennyező vegyület tulajdonságai (elektronszerkezete, vízdoldhatósága, halmazállapota stb.), valamint a talaj sajátosságai szabják meg (Filep és mtsai, 1999).

A peszticidek és egyéb szerves mikroszennyezők a talajoldatban kationok, anionok vagy poláros és apoláros molekulák formájában lehetnek jelen. Megfelelő pH-tartományban, a gyenge bázis és gyenge savkarakterű peszticidek enyhén poláris molekulái is ionizálódnak. A gyenge savak, így a fenoxi karbonsavak savas közegben semleges molekulák, gyengén lúgos és lúgos kémhatásnál azonban protonvesztéssel anionokká alakulnak. A főként negatív töltésű talajkolloidok a nem disszociált molekulákat gyenge fizikai erőkkel kötik, az anionos formákat pedig taszítják. A gyenge szerves savak molekulái tehát számottevő mennyiségben csak savanyú kémhatású és nagy szervesanyag tartalmú talajokban adszorbeálódnak (Gruiz és mtsai, 2001).

A csoport tagjai mobilisak a talajba kerülve, akár a talaj C zónájáig is eljuthatnak, ugyanakkor jellemzően nem perzisztensek, gyengén kötődnek. A 2,4-D könnyen lebomlik mind a talajban ($DT_{50} = 13$ nap), mind a vízben (feleződési ideje oxigéndús környezetben 8-25 nap). Az MCPA 4-kloro-2-metilfenollá degradálódik, féléletideje 7-41 nap. A maradék közelítőleg 3-4 hónapig marad aktív a 100%-os lebomlás előtt. Vízben a fotolízis fokozza bomlását, így féléletideje 19-20 nap (Soderquist és Crosby, 1975). A mekoprop 4-kloro-2-metilfenollá degradálódik, amely folyamatra erősen hat a talaj mikrobiális tevékenysége. Féléletideje 7-13 nap, a maradék kb. 2 hónapig aktív. Vízben féléletideje akár 5 hét is lehet, de a mikrobiális bontás nagymértékben gyorsíthatja a folyamatot. A diklórprop 2,4-diklórfenollá degradálódik, DT_{50} : 21-25 nap. A metabolikus bontás miatt a csurgalékvízben csak nyomokban jelenik meg (Bukowska, 2006; Cobb és Reade, 2010).

Ezen tulajdonságoknak köszönhetően a fenoxi-alkán-karbonsav vegyületek könnyen kimosódnak a talajból, illetve elbomlanak. A bomlási folyamatokat elősegíti a talaj mikrobiális tevékenysége, melynek aktivitását befolyásolja a hőmérséklet, a pH és a nedvességtartalom (Filep és mtsai, 1999). Relatív rövid féléletidejük, valamint biodegradációs tulajdonságaik ellenére is a 2,4-D hazánkban az egyik leggyakoribb talajszennyező, de vízszennyezőként is ismert (Maloschik és mtsai, 2007), és a többi fenoxi-alkán-karbonsav típusú vegyület is gyakorta kimutatható környezeti mintákból szermaradékként.

A növényvédő szer hatóanyagok a permetezést követően rövid időre megjelenhetnek a levegőben is szennyezőként. A gőzfázisban lévő hatóanyagok leggyakrabban a fotokémiai reakciók során létrejövő hidroxil gyökökkel lépnek reakcióba, mely féléletidejüket levegőben 20-40 órára csökkenti (Meylan és Howard, 1993). A gőzök a levegőből száraz vagy nedves ülepedéssel is eltávozhatnak.

A hatóanyagok kereskedelemben kapható különböző formulái közül a Na-, K-, és alkáli-amin származékok vízben jól oldhatóak, míg a kevésbé vízdékony észteres vegyületeket jellemzően emulzióként hozzák forgalomba. Az alacsonyabb móltömegű észterek illékonyabbak, mint a savas, sós, illetve hosszú láncú észterekkel kapcsolódott formák (Kidd és James, 1991).

A 2,4-D felhasznált formulái közül gyakoribbak a savamid, illetve annak sója, melyek jobban oldódnak vízben, mint a vegyület savas formája. Emellett használják észter származékát is, mely szerves oldószerekben jól oldható (Charles és mtsai, 1999a).

2.1.2. Fenoxi-alkán-karbonsav típusú gyomirtó szer hatóanyagok toxicitása

2.1.2.1. Toxicitásuk mikroorganizmusokon

A magasabb rendű szervezetekhez hasonlóan a mikrobiális közösségek is képesek felvenni, metabolizálni, kumulálni a herbicideket (Sura és mtsai, 2012).

A 2,4-D általában nem toxikus sem a vízi, sem a szárazföldi mikroorganizmusokra az ajánlott dózis alkalmazása esetén, mely a 600 g/l hatóanyagtartalmú Dezormon növényvédő szer esetében például 1-1,2 l/ha (Ocskó és mtsai, 2009).

Igen magas (400 mg/l) koncentráció mellett az algák nitrogén-fixációs képessége csökken. A 2,4-D koncentrációjának növekedésére a talaj felső rétegeiben élő nitrogénkötő algák reagálnak a legérzékenyebben. Szintén gátló hatású minden típusú talajban élő gombára 25-50 mg/l-es dózisban (IPCS international programme on chemical safety health and safety guide no. 5., 1987). Mind a 2,4-D, mind a az MCPA képes kis dózisban is (2,92 mg/l; 1,4 mg/l) gátolni egyes cianobaktériumok, így a *Microcystis* spp., *Pseudoanabaena*, *Aphanizomenon* fajok szén felvételét (Peterson és mtsai, 1994).

Az MCPA-t ugyan gyengén toxikusnak találták a talaj baktériumflórájára nézve, de ez a hatás nem volt letális, amennyiben a mezőgazdasági gyakorlatban ajánlott dózisokat alkalmazták a tesztek során (Tejada és mtsai, 2010).

2.1.2.2. Toxicitásuk vízi szervezeteken

A 2,4-D alkalmazása során, az ajánlott dózis mellett a vízbe kerülő várható koncentráció maximálisan 50 mg/l, ez a legtöbb vízi szervezet számára messze a toxikus dózis alatt van (Kidd és James, 1991).

A diklór-fenoxi-ecetsav, valamint sója kevésbé toxikus vízi szervezetek számára, mint ennek észtereszített formája, mely halak számára könnyebben felvehető. A víz hőmérsékletének növekedésével a fajok érzékenysége is megnő. Szintén befolyásoló tényező lehet a víz keménységi foka (Alexander és mtsai, 1985). A NOEL (a legnagyobb, még hatást ki nem váltó dózis) mértéke a halak esetében fajonként eltérő, az ismert dózisok 1 mg/l (*Oncorhynchus kisutch*) és 50 mg/l (*Oncorhynchus mykiss*) között találhatóak. A kételtűek lárvái közül a vizsgált fajok jól tolerálják a 2,4-D

jelenlétét vízben, a 96 órás LC₅₀ érték esetükben 100 mg/l felett volt (Kidd és James, 1991).

Az MCPA kis mértékben toxikus édesvízi szervezetekre, a mért LC₅₀ értékek 117-232 mg/l közé esnek szivárványos pisztráng esetében. *Xenopus* fajoknál 2000 mg/l esetében teratogén hatásokat okozhat, míg az LC₅₀ dózis 3600 mg/l volt (Bernardini és mtsai, 1996). A tanulmányok szerint vízi gerinctelenekre az MCPA nem toxikus (Kidd és James, 1991).

A mekoprop gyenge kumulációra hajlamos halakban, az LC₅₀ értéke szivárványos pisztrángra vonatkozóan 96 órás tesztben 124 mg/l volt, míg a kékkopoltyús naphal esetében 100 mg/l (Meister, 1994).

2.1.2.3. Toxicitásuk szárazföldi szervezeteken

Szemben a vízi szervezetekkel, a szárazföldi rovarok számára a 2,4-D észteres formája kevésbé toxikus a vegyület sójánál. Mézelő méhek esetében már kis mennyiségű kipermetezett szer is reprodukció csökkenést okozhat. Bár méhekre a legtöbb auxin hatású herbicid nem toxikus, ez alól kivételt képez a 2,4-D, mely csökkenti a rovarok reprodukciós képességét, ugyanakkor az alacsony koncentrációnak kitett állatok szignifikánsan tovább éltek, mint a kontrollban lévő társaik. Az LD₅₀ érték méhekre 2,4-D esetében 11,5 µg/méh, ez az érték MCPA esetében 104 µg/méh (Kidd és James, 1991). A többi forgalomban lévő hatóanyag (pl. mekoprop, diklórprop) a jelenlegi irodalmi adatok szerint nem toxikus méhekre.

Madarak esetében gyengén vagy egyáltalán nem mutatkozott a vegyület toxikusnak a vizsgálatokban, az LD₅₀ érték 1000 mg/ttkg vadkacsa, 272 mg/ttkg fácán esetében. A legtöbb tanulmány, amely madártojásokat vizsgált 2,4-D-vel befecskendezve vagy lepermetezve, nem talált negatív hatást. Ettől eltérő eredményeket kaptak vadkacsatojásokon: ezekbe fecskendezve 5 mg 2,4-D-t az 85%-ban csökkentette, 10 mg pedig 100%-osan gátolta az embriók fejlődését (IPCS International Programme on Chemical Safety Health and Safety Guide no. 5., 1987).

A 2,4-D a szervezetbe nemcsak *per os* kerülhet, de könnyen abszorbeálódik a bőrön keresztül, illetve respiráció útján is. Az emlősök szervezetében a vegyület gyorsan kiválasztódik a vizelettel, javarészt metabolikus átalakítások nélkül. A féléletideje a szervezetben emlősök esetén 10-20 órára tehető. Patkánynak 1mg/ttkg-ot

adagolva *per os* a legmagasabb dózist 6-8 óra után lehet mérni a szervekben, így a vérben, májban, vesékben és a tüdőben. Alacsonyabb koncentráció mérhető az izom- és agyszövetben. 24 óra elteltével a szövetekben már nem mutatható ki a vegyület.

Az LD₅₀ érték egér esetében 550 mg/ttkg MCPA-ra, 650 mg/l a mekopropa és 400 mg/ttkg a diklórpropra vonatkozóan. Ugyanezek az adatok patkány esetében 700, 1500 és 800 mg/ttkg (Seiler, 1978). A mekoprop madarakra gyengén toxikus, LC₅₀ értéke 5000 mg/kg volt fogas fürj, és több, mint 5600 mg/kg tőkésréce esetében (Meister, 1994). Mekoprop, diklórprop és MCPA hosszú távú hatásait vizsgálva kétéves teszt során azt találták, hogy patkányok esetében a vesében és májban okoznak elváltozást 100; 300; illetve 80 mg/kg dózisban, orálisan adagolva (Bond és Rossbacher, 1993).

2.1.2.4. Humán toxikológiájuk

A fenoxi-alkán-karbonsav hatóanyagok a gasztro-intesztinális traktuson át könnyen, a tüdőn keresztül gyengén, bőrön át csak igen minimálisan képesek felszívódni. A zsírszövetben csak kismértékben raktározódnak, a szervezetben nem hajlamosak kumulálódni: általában a vizelettel távoznak. Átlagos féleletidejük humán szervezetben alacsony, 13-39 óra közé tehető. A hatóanyagok biotranszformációja a szervezetben limitált, leggyakrabban proteinekhez kötődnek, és így ürülnek ki (Arnold és Beasley, 1989).

A humán expozíciónak a mezőgazdasági munkások, illetve a gyártási folyamatokban résztvevők a leginkább kitétek, de a fenoxi-ecetsavak felhasználása a mezőgazdasági gyakorlatban a teljes humán populáció számára potenciális szennyező forrást jelenthet. Az expozíció a szerek felhasználása, kipermetezése közben leggyakrabban a bőrön át felszívódva történik, ritkábban a inhaláció útján (Kolmodin-Hedman és mtsai, 1983).

Számos nemzetközi tanulmány vizsgálta a mezőgazdasági dolgozók körében a nem Hodkin-típusú limfóma (NHL) okozta halálozást, és a legtöbb esetben azt találták, hogy ennek aránya korrelál a 2,4-D alkalmazásával töltött idővel, vagyis minél több napot töltöttek a gazdák a 2,4-D felhasználásával kapcsolódó tevékenységekkel, annál nagyobb gyakorisággal diagnosztizálták náluk a NHL-t (Zahm és Blair, 1992; Bond és Rossbacher, 1993). Kimutatható összefüggést találtak az MCPA-nak történő kitétség,

és az epeutakban, gyomorban, illetve a hasnyálmirigyben megjelenő rákos megbetegedések között is mezőgazdasági munkások esetében (Bond és Rossbacher, 1993).

A 2,4-D, és a benne szennyezettségi profilként jelen levő dibenzo-dioxinok okozta humán megbetegedések vizsgálatában kiemelkedő szerepe van a II. világháború Vietnámban szolgált veteránjainak, valamint a vietnámi lakosságnak. A 2,4-D és a 2,4,5-T voltak a hatóanyagai az 1950-es években Vietnámban a dzsungel kiirtására széles körben alkalmazott Agent Orange nevű herbicidnek, amely számos egészségügyi problémát okozott hosszú távon a kitett területeken tartózkodóknál (Aylward és mtsai, 2010).

Az Amerikai Tudományos Akadémia Egészségügyi Intézetének 2002-ben megjelent besorolása szerint az Agent Orange egyértelműen összefüggésbe hozható a vietnámi veteránok esetében a légyszöveti szarkóma, a nem Hodgkin-típusú limfóma, a Hodgkin kór és a krónikus limfotikus leukémia kialakulásával, emellett számos egyéb típusú rákos megbetegedés esetleges okozója lehet (Ibrahim és mtsai, 1991; Zahm és Blair, 1992; Bond és Rossbacher, 1993; Frumkin, 2003)

A WHO jelenlegi besorolása szerint a 2,4-D, MCPA, a mekoprop és a diklórprop is a III.-as, azaz kevésbé veszélyes kategóriába tartozik.

Mind a Dezormon, mind az Optica trió az I.-es forgalmi kategóriájú növényvédő szerek közé tartoznak. Az I. forgalmi kategóriába olyan készítményeket sorolnak, amelyeket csak felsőfokú növényvédelmi szakképesítéssel rendelkező forgalmazhat, árusíthat, vásárolhat és használhat fel. Ide tartoznak a méregjelzés szerinti erős mérgek, illetve a maró, az erősen irritatív, továbbá a mutagén, a karcinogén, a teratogén, a fokozott egészségkárosító veszélyt rejtő szerv- és fajspecifikus hatású, és a nem ismert ellenmégű szerek (Ocskó és mtsai, 2013).

2.1.3. Fenoxi-alkán-karbonsav típusú gyomirtó szer hatóanyagok mutagenitása

A disszertációban tanulmányozott négy fenoxi-karbonsavat számos alkalommal vizsgálták Ames tesztben, a legtöbb esetben negatív eredménnyel. Minden alkalmazott törzs esetében (TA 97, TA 98, TA 100 és TA 102) negatív eredményt hozott a diklórprop vizsgálata metabolikus aktivátor jelenlétében és anélkül is (Mersch-Sundermann és mtsai, 1988; de Veer és mtsai, 1994). Szintén negatív volt a mekoprop mutagenitása TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 és TA 1538 törzsek esetében (Mersch-Sundermann és mtsai, 1988). A 2,4-D-t és az MCPA-t gyengén mutagénnek találták 250-750 µg/plate koncentrációk között a TA97a törzsön, de csak S9 metabolizációs aktiváló faktor jelenlétében, tehát ebben az esetben a hatóanyagok promutagénként viselkedtek (Kappas, 1988). A többi vizsgált törzsnél (TA 97, TA 98, TA 100 és TA 102) nem találtak mutagén hatást az MCPA és a 2,4-D esetében (Kappas, 1988; Charles és mtsai, 1999a).

Valamennyi auxin hatású peszticid hatóanyag közül a 2,4-D-t vizsgálták a legtöbbet. A mutagenitás tesztek eredményei a 2000-es évig egybehangzóan negatívnak kiáltották ki a 2,4-D-t (Charles és mtsai, 1999b; Gollapudi és mtsai, 1999). Ezt követően, a tesztek fejlődésével, érzékenyebb módszerek felhasználásával számos pozitív eredményt hozó tesztet végeztek. A 2,4-D-t vizsgálva a következő mutagén hatásokat találták: *Allium cepa* tesztben kromoszóma aberrációt okozhat (Ateeq és mtsai, 2002), *Arabidopsis* tesztben A→G pontmutációt (Filkowski v, 2003), *Drosophila melanogaster*-ben a testi kromoszómák mutációját indukálhatja, ezáltal mutáns szárny szőr sejteket hoz létre (Kaya és mtsai, 2000). Egerek csontvelejét vizsgálva úgy találták, hogy fokozza a testvérkromatida kicserélődést és a kromoszóma aberrációkat (Amer és Aly, 2001; Madrigal-Bujaidar és mtsai, 2001), humán limfocitákban a mikronukleusz képződést és a kromoszóma törést (Holland és mtsai, 2002; Zeljezic és Garaj-Vrhovac, 2004), *Channa punctatus* halfaj eritrocitáiban pedig a mikronukleusz képződést fokozta (Farah és mtsai, 2006). A vizsgálatokban az alkalmazott, hatásos dózisok 1-200 mg/l között voltak, de már 100 µ/l-es dózisban is kimutatható volt az A→G pontmutációk szignifikáns növekedése, ez a dózis pedig a 2,4-D-re vonatkozó megengedett egészségügyi határérték az ivóvízben (Filkowski és mtsai, 2003).

Az MCPA kevesebb tesztben akadt fent pozitív eredményt adva, mint a 2,4-D, de találunk mutagenitására adatokat az irodalomban. Mutagénnek találták a nemhez kötött letális tesztben *Drosophila melanogaster*-en (Lee és mtsai, 1983), és pontmutációt okoz *Saccharomyces cerevisiae*-n (Zimmermann és mtsai, 1984), valamint gyenge mutagén hatást mutat hörcsögöknél az ovárium sejtjeiben és a csontvelőben (Bond és Rossbacher, 1993).

A mekoprop esetében az irodalom kromoszóma aberrációról, illetve nagy dózisban (4-38 mg/kg) alkalmazva aranyhörcsögnél testvérkromatida kicserélődésről tesz említést (US EPA, 1988a).

A diklórprop képes növelni a mutáns sejtek arányát *Saccharomyces cerevisiae* tesztben, valamint pontmutációt okoz *E. coli*-nál 4 g/l-es dózisban (Anderson és mtsai, 1972; US EPA, 1988b).

2.2. Mutagenitási és toxicitási tesztek áttekintése

A környezetbe kerülő kemikáliák okozta problémák közül az egyik legsúlyosabb a genotoxikus és mutagén hatások, mivel ezek nem csak számos egészségügyi probléma forrásává válhatnak, de a változások átörökíthetőek az eljövendő generációkra is (Leme és Marin-Morales, 2009). A géntoxikológiai tesztekben egy konkrét vegyületnek az örökítő anyagra gyakorolt hatását vizsgálják. E biotesztek esetében a vizsgálat végpontja a mutáció megjelenése.

A mutációs teszteket az alkalmazott célszervezetek, illetve a végpontok alapján csoportokba sorolhatjuk. A prokarióta szervezeteket alkalmazó biotesztek képesek detektálni a génmutációt és az elsődleges DNS károsodást okozó anyagokat. Az eukariótákat felhasználó tesztek azonban ezen felül a kromoszómák károsodása vagy az aneuploidizmus kimutatására is alkalmasak (Houk, 1992).

A vizsgálni kívánt anyagot először *in vitro* teszteknek vetik alá. Ezek általában kevésbé idő- és költségigényesek, mint az *in vivo* tesztek, másrészt, ha már az első vizsgálatok során mutagénnek mutatkozik a vizsgált minta, sok esetben nem kerül sor a további tesztekre, így elkerülhető az élő állatok felesleges felhasználása (Kirkland és mtsai, 2005). Míg ma az egészségügy a gerinceseken végzett vizsgálatokat tartja inkább fontosnak, a környezettudományi területen a talaj élőközössége miatt a mikrobiális tesztek és a gerinctelen állatok eredményeit tekintik relevánsnak (Zeiger, 2010).

2.2.1. Egysejtűeken végzett tesztek

A prokarióta egysejtűeket alkalmazó tesztek legnagyobb előnye, hogy a felhasznált tesztszervezetek egyszerűen kezelhetők, ugyanakkor az eljárások viszonylag gyors eredményt adnak, így költséghatékonyak. Ezekkel az eljárásokkal génmutációkat detektálhatunk (kereteltolódás, bázispárcsere). A legnépszerűbb eljárásnak máig az Ames teszt mondható (Ames és mtsai, 1973a; Ames és mtsai, 1973b; OECD, 1997a), de mellette tért hódítanak egyéb tesztek is, mint az SOS-Chromo teszt, az umu teszt, vagy a Mutatox teszt (Ohe és mtsai, 2004; White és Claxton, 2004; Zeiger, 2010). Az Ames teszt nagy előnye, hogy hatalmas adatbázis áll a kutatók rendelkezésére az eddig vizsgált anyagokkal kapcsolatos eredményekről, amely megkönnyíti a további kísérletek tervezését. Emellett az elvégzett összehasonlító vizsgálatok is az Ames tesztet

találták a legérzékenyebbnek (Legault és mtsai, 1994; White és Claxton, 2004). A prokarióta tesztek népszerűsége napjainkban sem csökken, de sok kutató mindinkább a teljes automatizálás elérésére törekszik. Ennek nagy előnye a munka leegyszerűsítése és gyorsítása mellett a sztenderdek könnyebb betarthatósága is (Brinkmann és Eisentraeger, 2008).

2.2.2. Növényi tesztek

A mutagenitás vizsgálatok között növényi teszteket is alkalmaznak. Így például az ionizációs sugárzás hatásait már az 1930-as években vizsgálták *Allium* és *Tradescantia* fajokon. Napjainkban a legelterjedtebb tesztek a kukorica (*Zea mays*) waxy lókuszának mutagenitás vizsgálata, a *Tradescantia* fajokon végzett porzószálszőr teszt és mikronukleusz vizsgálat, a vöröshagyma (*Allium cepa*) tenyészőcsúcsán végzett vizsgálat és a lúdfű (*Arabidopsis*) termésének analízise (White és Claxton, 2004). A felhasznált növények tökéletes tesztalanyok jól kezelhető kromoszómáik és szenzitivitásuk miatt, ezért alkalmazásuk széles körben elterjedt, és napjainkban számos teszt sztenderdjét alkalmazzák a laboratóriumok világszerte (Leme és Marin-Morales, 2009). Különösen kedveltek a talajminták monitorozásakor, hiszen ez a növények alapvető tápláló közege.

***Allium cepa* teszt**

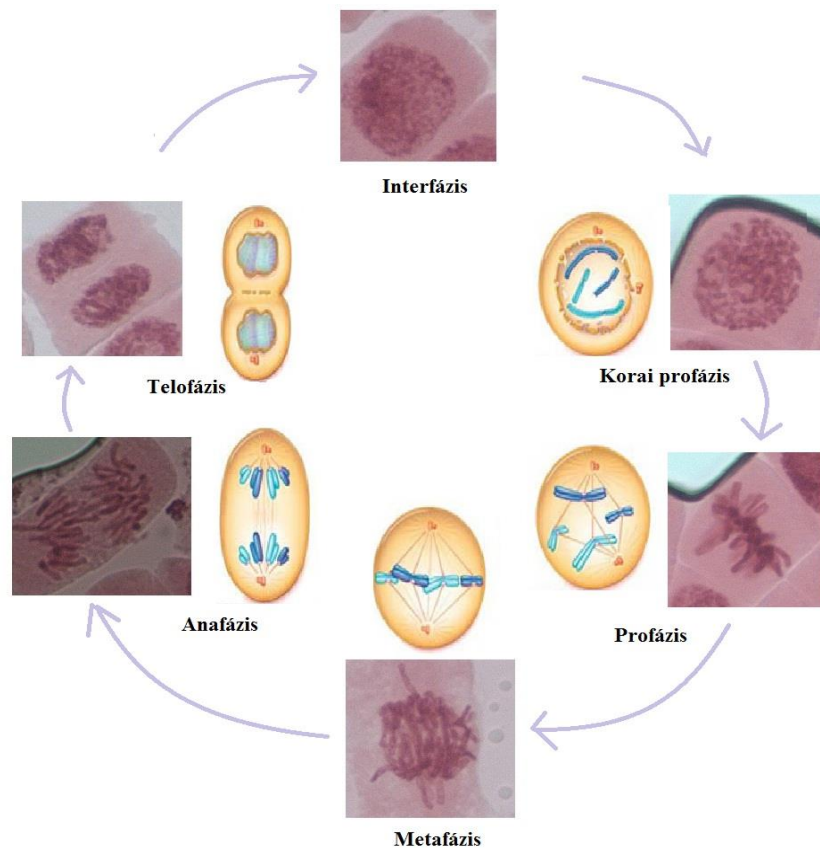
Az *Allium* fajok 16, nagy méretű kromoszómáján igen jól láthatóak az elváltozások, aberrációk, így a vöröshagyma már az 1930-as évek óta kedvelt célszervezet biotesztekben (Levan, 1938). A környezeti minták monitorozására alkalmas mutagenitás tesztet Fiskesző fejlesztette ki 1985-ben. A teszt egyaránt alkalmas vízdékony és vízben nem oldható anyagok, komplex keverékek vizsgálatára.

A teszt során a hagymát csíráztatják, majd a néhány centis gyökérkezdeményeket a vizsgálandó anyag hatásának teszik ki 24-48 óra hosszat, egy mitotikus fázis idejére (3. ábra). Ezután a gyökérszőrökből ana- vagy telofázisban lévő sejteket izolálnak, és ezen vizsgálják a fellépő kromoszóma aberrációkat (Fiskesző, 1985). A teszt egyaránt alkalmazható citotoxicitás (effektív koncentráció értékek) és genotoxicitás vizsgálatára. Az *Allium* teszt nagy előnye olcsósága és egyszerű kivitelezhetősége mellett a vöröshagymában található oxidáz enzimrendszer, amely szükséges a promutagén anyagok detektálásához (Nielsen és Rank, 1994). Így míg

például az Ames teszt esetében S9 patkánymáj kivonat hozzáadása szükséges a tesztrendszerhez a promutagén anyagok kimutatására, az *Allium cepa* rendelkezik a metabolikus enzimrendszerrel, mely segítségével a promutagéneket mutagénné alakítja át. Bár a növényekben fellelhető oxidáz enzimrendszer alacsonyabb koncentrációban termelődik és limitált a szubsztrát-specifikussága az emlősök citokróm P-450 enzimrendszeréhez mérten, az *Allium cepa* tesztek eredményei így is összevethetőek az emlősöket felhasználó tesztek eredményeivel (Rank és Nielsen, 1997).

A leggyakrabban vizsgált kromoszóma aberrációk a következők:

- Ragadós kromoszómák: ezek általában erősen toxikus, irreverzibilis hatásra utalnak.
- Kromoszóma hidak és fragmentek: kromoszóma vagy kromatida törés során jönnek létre.
- C-mitózis: a húzófonalak irreverzibilis károsodása az osztódás során.
- Levált teljes kromoszóma: gyenge c-mitotikus hatás eredményeként jön létre, aneuploidizmust eredményezhet.



3. ábra. Az *Allium cepa* mitotikus sejtosztódásának szakaszai (fotó: Bokán)

2.2.3. Állatokkal végzett tesztek

2.2.3.1. Gerinctelenek

A legkedveltebb tesztszervezet a gerinctelen többsejtűek közt az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*). Az 1900-as évek elején Thomas Hunt Morgan használta először genetikai kísérleteiben, melyek során az ivarhoz kötött öröklődést kutatta (Raju, 1999). Azóta is kedvelt tesztállat kis mérete, rövid generációs ideje és nagy utódszáma, olcsó és egyszerű tenyésztetősége, egyszerű keresztezhetősége és alacsony kromoszóma száma (4 pár) miatt. További előnyt jelent az a különleges sajátossága, hogy lárvális szöveteinek sejtjei ún. politén óriás kromoszómákkal rendelkeznek, amelyben fénymikroszkóp alatt még az egyes gének is jól kivehetők. 2000-ben befejeződött a teljes ecetmuslica genom nukleotid sorrendjének meghatározása, ami nagyban megkönnyíti a molekuláris szintű vizsgálatokat (White és Claxton, 2004).

2.2.3.2. Gerincesek – *in vitro*

A környezetbe kerülő lehetséges mutagének vizsgálatához hagyományosan gerinceseket felhasználó bioteszteket alkalmaztak, gyakran patkányt, tengerimalacot, egeret vagy különféle halfajtákat használva tesztállatként. Ezek a tesztek azonban nem csak drágák és időigényesek, de szemben állnak az Európai Unió direktívákkal is, melyek kimondják, amennyiben lehetséges, a kemikáliák teszteléséhez a laborban a magasabb rendű állatokat (gerinceseket) alacsonyabb rendű fajokkal vagy sejtvonallakkal kell helyettesíteni (86/609/EEC, valamint EC, Regulation, No. 1907/2006). A sejtvonalak használata mellett nem csak az állatvédelmi szempontok, de az ezeket felhasználó tesztek gyorsasága, egyszerűsége és költséghatékonysága is szól (Papaefthimiou és mtsai, 2004).

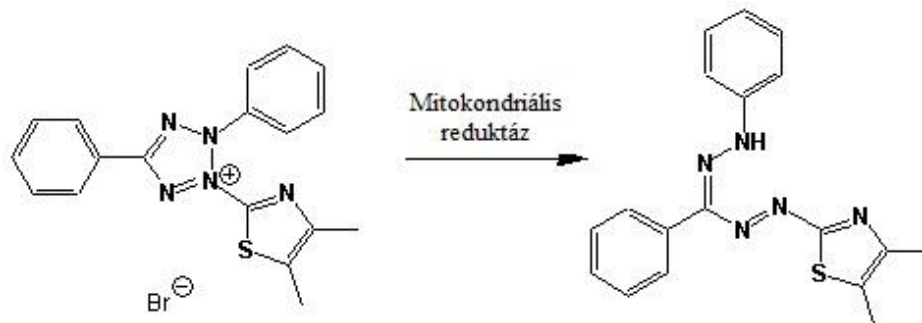
A gerinceseken végzett *in vitro* vizsgálatokat izolált sejtvonalakon végzik, amelyeket általában egérből, patkányból vagy hörcsögből származó petesejtek, limfociták vagy fibroblasztok alkotnak (OECD 476, 1997b). Ezen *in vitro* tesztek alkalmasak kromoszóma-aberráció, DNS-törés, mikronukleusz-képződés, örökletes transzlokáció, soron kívüli DNS-szintézis és testvérkromatid-csere kimutatására (White és Claxton, 2004). A humán sejtvonalak limfocita, fibroblaszt és tumorsejtekből származnak (Dearfield és mtsai, 2011).

A halsejtek felhasználása elterjedt a genotoxikológiai vizsgálatok során (Kocan és mtsai, 1985; Al-Sabti és Metcalfe, 1995). Elsőként a '60-as években végeztek

halsejtvonalakon bioteszteket tűzcselle (*Pimephales promelas*) és szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) halfajok felhasználásával (Wolf és Quimby, 1962). Napjainkban számos eltérő eredetű halsejtvonalat használnak fel mutagenitás vizsgálatokban, így például hepatocitákat, kopoltyú sejteket, leukocitákat, fibroblasztokat (Kocan és mtsai, 1985; Kammann és mtsai, 2001, 2004). A halsejt kultúrákkal végzett mutagenitás tesztek az emlős sejtekkel végzett tesztekkel megegyező eredményeket adnak, ugyanakkor a halsejtek eurythermek, vagyis tág hőmérsékleti tartományon tarthatóak, így a vizsgálatok során a hőmérséklet is vizsgálható, mint a mutagén hatásokat esetlegesen befolyásoló paraméter (Babich és Borenfreund, 1991).

MTT teszt

A sejtenyészeteket alkotó sejtek életképességét a gyakorlatban kolorimetriás eljárásokkal szokás vizsgálni, melyek során az életképes sejtek megszámlálhatóak, miután specifikusan kötődő festékekkel festették meg azokat. Ilyen, általánosan elterjedt eljárás a tripánkék festés, mellyel a sejtmembrán integritása, és ennek segítségével a sejt proliferációja vizsgálható, azonban ez a módszer nem elég szenzitív a toxicitás mértékének megbecslésére. Az MTT (metil-tiazol tetrazolium) teszt egy tetrazolium só (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) formázán származékká történő redukcióján alapul (Mosmann 1983, Gerlier és Thomasset 1986). Az élő, metabolikusan aktív sejtek mitokondriumában az intracelluláris NAD(P)H oxidoreduktáz enzim képes a sárga színű tetrazol redukciójára mely során bíbor formázán képződik (4. ábra). A színváltozás mértéke kolorimetriásan kimutatható, és korrelál az élő sejtek arányával. Ezzel az egyszerű és gyors spektrofotometriás módszerrel jól jellemezhető a sejtek energiatermelő mitokondriumainak állapota.

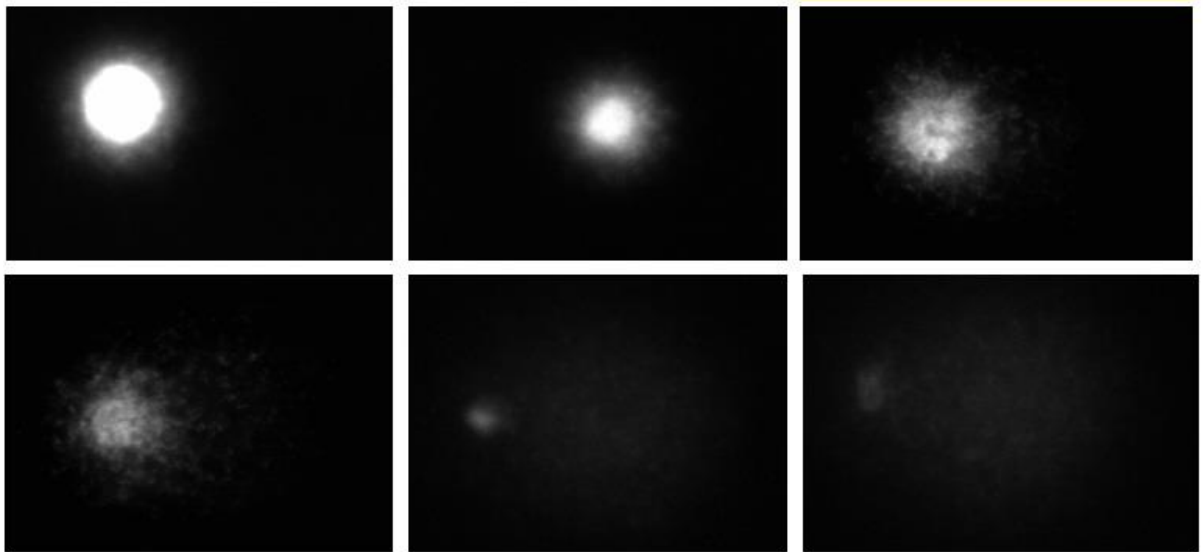


4. ábra: az MTT teszt molekuláris háttere

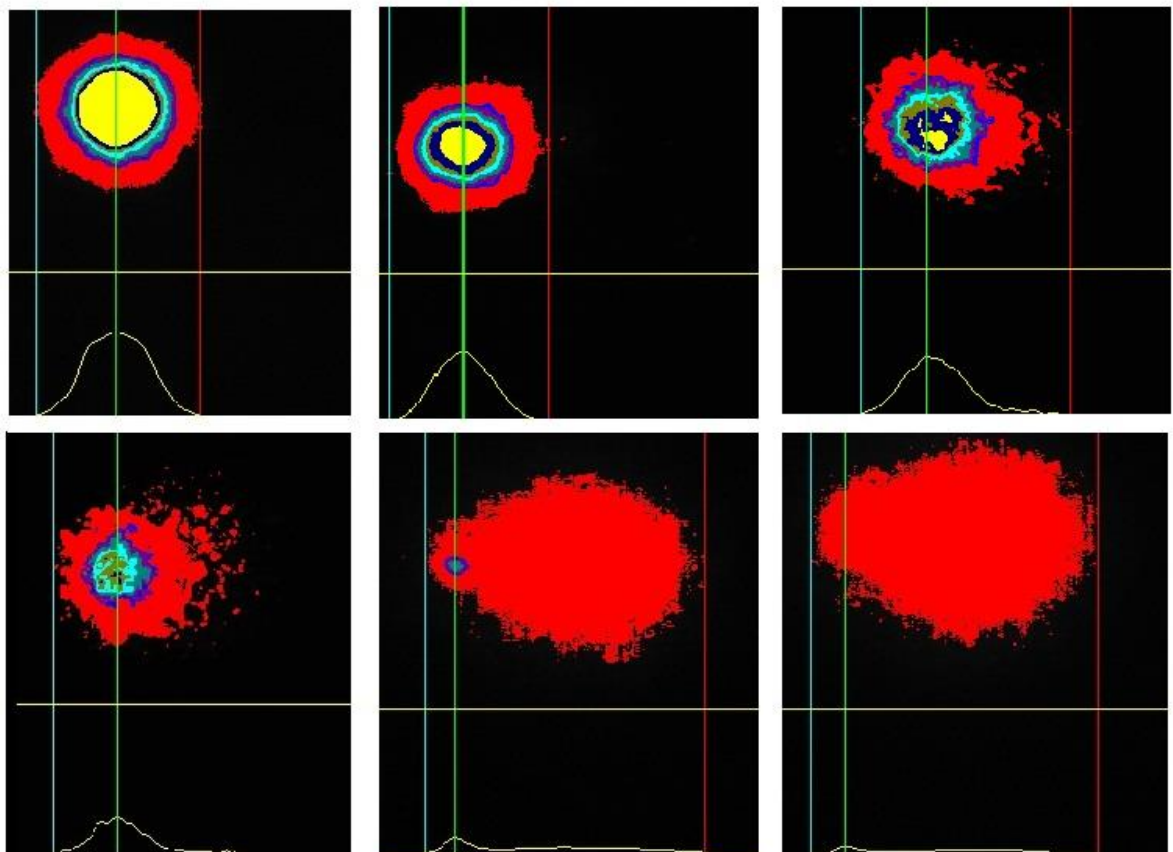
Comet teszt

A környezeti DNS-károsító hatások vizsgálatára széles körben elterjedt módszer a Singh által 1988-ban leírt ún. egy sejt gél elektroforézis, vagy comet teszt. A módszer lényege, hogy a vizsgálandó anyaggal előzetesen kezelt sejteket agaróz gélbe ágyazva alkalikus lízis után megfuttatva, a károsodott DNS-szálak kihurkolódnak a sejtmagból és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva üstökös szerű képet mutatnak (Singh és mtsai, 1988). A teszt alkalmas az egyszeres és kétszeres DNS-törések kimutatására is. Az egyszeres törés esetén a hiszton fehérjékre feltekeredett DNS-szál egy helyen eltörik, így a szoroson feltekert hurkok kilazulnak, ez képezi a csóvát. Kettős törés esetén az adott DNS-szakasz kiesik, így a csóva szemcsés lesz, mivel azt DNS-fragmentumok alkotják (Collins és mtsai, 2008; Shaposhnikov és mtsai, 2008). Az üstökös csóvájának hossza arányos a sejtet ért károsodás mértékével (Fairbairn és mtsai, 1995). A módszer alkalmas a DNS szál törésének sejt szintű kimutatására (Tice és mtsai, 2000).

A comet teszt elterjedt, és igen jól használható vizsgálat környezeti minták elemzésére. Nagy előnye, hogy viszonylag kevés sejt szükséges az elvégzéséhez, valamint a módszer lehetővé teszi a DNS károsodásának vizuális megjelenítését minden egyes sejt esetén (Cotelle és Férard, 1999) (5., 6. ábra). A teszt elvégzésére minden sejtmaggal rendelkező sejt alkalmas. Számos esetben használták sikerrel környezeti minták mutagén hatásainak kimutatására. Alkalmazták például földigilisztákon talajszennyezések kimutatására (Salagovic és mtsai, 1996), ebihalak sejteinek felhasználásával vizsgálták peszticidek DNS károsító hatásait (Clements és mtsai, 1997) és számos halfajt alkalmaztak *in vivo* vizsgálatokban (Pandurangi és mtsai, 1995; Deventer, 1996; Nacci és mtsai, 1996). Az *in vivo* tesztek felváltása *in vitro* tesztekkel megfelel a nemzetközi irányelveknek. Számos genotoxikológiai vizsgálatban alkalmaztak már halsejtvonalakat (Kammann és mtsai, 2000; Pereira és mtsai, 2011). Az *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) sejtvonalat könnyű kezelhetősége tette népszerűvé, ezért számos vizsgálatban alkalmazták már (Superti és mtsai, 1988; Lamche és Burkhardt-Holm, 2000). Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy az EPC comet teszt megfelelő eszköz komplex környezeti minták mutagenitás vizsgálatához.



5. ábra. Comet testben vizsgált EPC halsejtek mikroszkopikus képe 400-szoros nagyításban (fotó: Bokán)



6. ábra. Comet testben vizsgált EPC halsejtek mikroszkopikus képe a Comet Assay III. képelemző szoftverrel megjelenítve (fotó: Bokán)

2.2.3.3. Gerincesek – *in vivo*

Az *in vivo* tesztek elvégzésére az *in vitro* tesztek után kerülhet sor. Ebben az esetben a vegyület a szervezet komplex enzimbizletével, teljes metabolizációs rendszerével találkozik, mely eltérő módon befolyásolhatja, megváltoztathatja a bekerült anyag sorsát (Zeiger, 2003).

A vizsgálatokhoz általában emlősöket, így patkányt, egeret, hörcsögöt használnak. Az akut vagy krónikus hatásnak kitett állatokat felboncolják, majd csontvelőjüket, májukat, gonádjaikat, esetleg embrióikat dolgozzák fel (Ohe és mtsai, 2004; White és Claxton, 2004).

A humán vizsgálatok igen ritkák, általában akkor kerülhet sor ilyenre, ha az alanyok foglalkozásuk során vannak kitéve mutagén hatásoknak, illetve ide tartoznak az epidemiológiai vizsgálatok, és a balesetek utáni felmérések. Leggyakrabban a vénás vér limfocitáinak állapotát elemzik, hiszen ezen sejtek élettartama több év is lehet, így hosszan megőrzik a mutagén hatások nyomait (Dearfield és mtsai, 2011).

2.3. Sejttenyészetek kezelése

A sejtek *in vitro* kultúrákban való tenyésztése, és ezek felhasználása a kutatások során a nemzetközi gyakorlat általánosan elfogadott része. Ez egyrészt megfelel az állatvédelmi szempontoknak, másrészt a kísérleti körülmények, a meghatározó paraméterek ebben az esetben könnyebben kontrolálhatóak, mint *in vivo* kísérletekben (Adamicza és mtsai, 2007).

A sejt kultúrát alkotják szuszpenzióban, illetve a tenyésztedény falához letapadva növekvő sejtek. Ez utóbbi esetben a sejtek mátrix fehérjéket termelnek, amelyek segítségével szorosan kitapadnak a tenyésztedény falához, és úgynevezett monolayer réteget hoznak létre. Ennek kialakításában az extracelluláris mátrix komponensei és a plazmamembrán, illetve az ahhoz kapcsolódó fehérjék játszanak szerepet. Így a sejttenyészetekben, jóllehet a szövethez képest kevésbé összetett szerkezet jellemző, mégis erős kötődés alakulhat ki a sejtek és a tenyésztedény fala, illetve a kapcsolódó sejtek között. A folyamatban a szuszpenzióban lévő Ca^+ ionok is szerepet játszanak (Lannan, 1994).

A tenyésztedényben a sejtek száma exponenciálisan növekszik, majd a növekedés elér egy olyan szakaszba, ahol a sejtek száma már nem nő tovább, összefüggő, konfluens kultúrát hoznak létre. Ebben az állapotban szükséges lehet a sejtek passzálása, vagyis új tenyésztedénybe és friss tenyészmediumba való áthelyezése. Ehhez azonban a sejteket szuszpenzióba kell vinni. Hasonlóképpen szükséges a sejtek leoldása a tenyésztedény faláról, ha azokkal kísérletet terveznek végezni (Adamicza és mtsai., 2007).

A sejtek szuszpenzióba viteléhez proteáz enzimeket vagy kelátképző anyagokat használnak. A proteázok a sejt-sejt, illetve sejt-mátrix kapcsolatokat szüntetik meg, így segítségükkel a sejtek egyesével oldatba vihetőek (Babich és Borenfreund, 1991). A proteázok közül leggyakoribb a tripszin alkalmazása. A tripszin egy, az emlősök gasztro-intesztinális rendszerében keletkező endopeptidáz. *In vivo* körülmények között a pancreasban képződik, és az oligopeptideket bontja hidrolízissel peptidekké. Sejt kultúrákban a tripszin a Ca-kelátor EDTA-val együtt hatékonyan választja le a sejteket a tenyésztedény faláról. Az EDTA szerepe a kalcium-függő kapcsolódások átmeneti felszámolása. Friss médium hozzáadásával a reakció leállítható (Tong, 1974; Rheinwald és Green, 1975).

A tripszin azonban, széleskörű felhasználása ellenére számos negatív mellékhatással rendelkezik. Túl nagy koncentrációban, vagy túl hosszú ideig alkalmazva károsítja a sejtmembránt, és a sejt halálához is vezethet. A tripszin fokozhatja az apoptózis regulátor proteinek expresszióját, és csökkentheti a metabolizmussal és növekedéssel kapcsolatos fehérjék termelődését, így zavarokat okoz a sejt működésében (Peralta Soler és mtsai, 1997; Huang és mtsai, 2010)

Mindeme, a proteázok felhasználása során okozott károsodások miatt célszerű olyan alternatív eljárások kidolgozása, melyek alkalmazásával a tripszin használata elkerülhető.

2.4. Komplex vegyületek kockázatbecslése

A környezetbe a szennyező vegyületek, így a peszticidek is, a legritkább esetben kerülnek ki izoláltan. A természetes ökoszisztémákban a toxikus hatások általában szennyező anyagok keverékéből származnak (Belden és mtsai, 2007; Syberg és mtsai, 2008). Az Európai Unió területén jelenleg mintegy 30000 vegyület van forgalomban. Ezen vegyületek lehetséges keverékeinek száma szinte végtelennek mondható, így az összes lehetséges keveréket letesztelni lehetetlen (Backhaus és mtsai, 2003). Éppen ezért a kemikáliák egyéni vizsgálatai során kapott eredményeinek keverékekre történő extrapolálhatósága igen fontos kérdés. A keverékek kockázata azonban nem becsülhető meg egyszerűen az összetevő vegyületek egyéni effektív koncentrációi alapján.

A szennyező komponensek ökototoxicitást befolyásoló kölcsönhatásainak eredménye lehet szinergikus, szigorúan additív, esetleg nem összegződő, sőt bizonyos esetekben antagonisztikus toxikológiai hatású is. Additív hatásnak nevezik, ha a keverék hatása megegyezik az összetevők hatásának összegével. Szinergizmusról beszélhetünk, ha a keverék hatása erősebb, mint a keveréket alkotó anyagok egyéni hatásának összege. Antagonizmus fellépéséről pedig akkor beszélhetünk, ha a keverék mért hatása gyengébb, mint az összetevők hatásának összege (Greco és mtsai, 1995).

Fontos, hogy a környezetbe kerülő potenciális szennyezőanyagok együttes hatásait előre megbecsüljük, a lehető legpontosabb modell alkalmazásával (Tichý és mtsai, 2002). Ezek segítségével az egyes vegyületekre vonatkozó toxicitási adatok extrapolálhatóak keverékekre is (Backhaus és mtsai, 2003). Napjainkban két, a

farmakológiából átvett modellt fogadnak el a legáltalánosabban, ezek az úgynevezett összeadó koncentrációk modellje (Loewe és Muischnek, 1926), illetve a független hatások modellje (Bliss, 1939). Az első a hasonló, míg a második modell a különböző hatásmechanizmusú összetevők keverékének várt effektív koncentrációjának kiszámítására alkalmas.

Bináris keverékek esetében, amennyiben az összetevők azonos hatásmechanizmussal fejtik ki hatásukat, a várt effektív koncentráció az alábbi egyenlet szerint számítható ki. $EC_{X_{mix}}$ a keverék effektív koncentrációja, p_1 és p_2 az összetevők aránya, EC_{X_1} és EC_{X_2} pedig az összetevők mért effektív koncentrációja (Thorpe és mtsai, 2006).

$$EC_{X_{mix}} = \left(\frac{p_1}{EC_{X_1}} + \frac{p_2}{EC_{X_2}} \right)^{-1}$$

Ternáris, illetve háromnál több összetevőből álló keverékek esetén a fenti egyenlet további elemekkel bővíthető. Az auxin típusú fenoxi-karbonsav herbicidek hatásmechanizmusa egymáshoz hasonló (Grossmann, 2000), ezért az összeadó koncentrációk modellje esetükben jól alkalmazható.

Az Európai Unió területén a kemikáliák legátfogóbb szabályozásáról 2007. június 1. óta a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról szóló rendelet (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, REACH) gondoskodik. A REACH rendszer célja olyan vegyi anyag regisztrációs rendszer létrehozása, amely lehetővé teszi azok nyomon követését, illetve azonosítását, akár árucikkekben vagy készítményekben fordulnak elő (European Commission, 2006).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált anyagok

A tesztekben felhasznált növényvédő szer hatóanyagok (4-kloro-*o*-toliloxi-ecetsav, 2,4-diklórfenoxi-ecetsav, 2-(4-kloro-2-metilfenoxi)propionsav, 2-(2,4-diklórfenoxi)-propionsav) analitikai tisztaságúak voltak, és a Dr. Ehrenstorfer GmbH-től szereztük be őket. Az Optica triót a Cheminovától, a Dezormont a Nufarmtól szereztük be. A Dezormon 600 g/l 2,4-D-t tartalmaz dimetil-ammónium só formájában, az Optica trió hatóanyaga pedig 310 g/l diklórprop-p + 160 g/l MCPA + 130 g/l mekoprop-p, szintén dimetil-ammónium só formában (Ocskó és mtsai, 2009).

Az alkalmazott dózisokat a mezőgazdasági gyakorlatban használt dózisok, illetve a környezeti mintákból visszanyert növényvédő szer maradékok mennyisége alapján állapítottuk meg. A mezőgazdasági gyakorlatban az ajánlott dózis Optica trióval történő permetezés esetén 1,5-2 l/ha, a Dezormon esetében ez 1-1,2 l/ha (Ocskó és mtsai, 2009).

3.2. Talajminták kezelése és a mintavételezés módszere

3.2.1. Üvegházi tenyészedényes vizsgálatok

A vizsgálatokat párhuzamosan végeztük el három különböző talajtípuson, amelyek a következők voltak:

A, Tőzeges virágföld: Tek-Land B típusú virágföld, melynek összetevői szélmezői tőzeg, komposzt, bazalt és homok.

B, Humuszos homoktalaj

C, Szolonyeces réti talaj

A talajok ismert tulajdonságait az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat. A kísérletekben felhasznált talajok fizikai és kémiai tulajdonságai. na = nincs adat (forrás: Murányi Attila)

	homokos	réti	tőzezes
pH H₂O	8,41	6,89	na
pHKCl	7,54	5,39	na
pHCaCl₂	7,73	6,16	5 - 6,5
KA	27	40	na
humusz	0,52%	2,15%	5%
C	0,3%	1,25%	na
CaCO₃	4,1%	0%	2%
összes N	0,06%	0,16%	200-500 mg/l
NH₄-N mg/kg	2,88	6,46	na
NO₃-N mg/kg	1,05	5,76	na
Fizikai talajféleség	homok	iszapos	iszapos
AL-P₂O₅ mg/kg	77	146	200-500
AL-K₂O mg/kg	41	173	300-1000
AL-Ca	2	0	na
AL-Na mg/kg	5	7	na

A vizsgálat célja az auxin típusú növényvédő szerek esetleges mutagén hatásának vizsgálata volt különböző típusú talajok 3 mélységi rétegéből származó extraktumain. Talajtípusonként 1 db, 50 cm átmérőjű cserepet töltöttünk meg 30 cm mélységig mindhárom típusú talajjal. Az előzetesen meglocsolt, így nedves talajokat 4 l/ha-nak megfelelő mennyiségű Optica trió növényvédő szerrel permeteztük be kézi permetezőt alkalmazva. A kipermetezett dózis a mezőgazdasági gyakorlatban javasolt dózis kétszerese volt (Ocskó és mtsai, 2009). A mintákat a kezelés utáni 3. és 7. napon vettük. A talajokat minden esetben a mintavételt megelőző napon 10 mm csapadéknak megfelelő desztillált vízzel locsoltuk meg. Edényenként 3 mintavételi pontból vettünk mintát, 3 rétegből: 0-5, 5-10 és 10-20 cm közötti rétegekből, Pürckhauer típusú kézi talajmintavevő segítségével. A továbbiakban az egy mintavételi rétegből származó 3

mintát egynek kezeltük. A mikrobiális tevékenység meggátolására a mintákat 3-5 napra -80 °C-ra fagyasztottuk, majd 5 °C-on tároltuk.

3.2.2. Szabadföldi vizsgálatok

A vizsgálatokban meghatározott mennyiségű (2, 4, 8, illetve 16 l/ha), ismert hatóanyag tartalmú fenoxi-ecetsav és -propionsav herbicid típusú növényvédő szerrel (MCPA, mekoprop és diklórprop tartalmú Optica trió készítmény) kezelt, szolonyeces réti talaj parcelláiból származó földmintákat analizáltunk. A vizsgálat célja az Optica trió növényvédő szer esetleges mutagén hatásának vizsgálata volt szabadföldi körülmények között.

A mezőgazdasági gyakorlatban az ajánlott dózis Optica trióval történő permetezés esetén 1,5-2 l/ha (Ocskó és mtsai, 2009). A kezelés során a parcellákat 2, 4, 8, illetve 16 l/ha-os dózissal készítménnyel permeteztük, mely az ajánlott dózis 1, 2, 4, illetve 8-szorosa. A parcellákra a permetlevet kézi permetezéssel juttattuk ki. A parcellák között 1 m-es kezeletlen sávot hagytunk. A kezelt parcellák 3X3 m-esek voltak, a kezelt terület összesen 2X5 darab parcellából állt (7. ábra). A parcellák borítottsága soronként eltérő volt, az első sor parlagra került, a második sorba kukoricát vetettünk. Az eltérő borítottság célja az volt, hogy vizsgáljuk, befolyásolják-e a parcellák különböző növény típusai a kipermetezett növényvédő szer talajba kerülését, illetve lebomlását. Míg a kukoricával bevetett parcellákon csak az egyszikű, Kiskun 4517 fajtájú silóhibrid kukoricánövény borította a talajt, addig a parlagon hagyott parcellákon megjelentek mind az egy-, mind a kétszikű gyomok, leggyakrabban *a Solidago canadensis*, *Taraxacum officinale*, *Convolvulus arvensis*, *Artemisia vulgaris*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Lolium perenne* és *Cirsium arvense* fajok.

A mintákat a kezelés utáni 3. illetve 7. napokon vettük. Parcellánként 5 random mintavételi pontot jelöltünk ki, azonban az egy parcelláról származó 5 mintát a továbbiakban egynek kezeltük. A mintákat az előzetesen elvégzett üvegházi vizsgálatok alapján a talaj felső 0-10 cm-es rétegéből vettük Pürckhauer típusú kézi talajmintavevő segítségével. A mikrobiális tevékenység gátlására a mintákat 3-5 napra -80 °C fokra fagyasztottuk, majd 5 °C fokon tároltuk.

Parlag, kezeletlen kontroll	Parlag, 2L/ha	Parlag, 4L/ha	Parlag, 8L/ha	Parlag, 16L/ha
Kukorica, kezeletlen kontroll	Kukorica, 2L/ha	Kukorica, 4L/ha	Kukorica, 8L/ha	Kukorica, 16L/ha

7. ábra. A szabadföldi vizsgálatok parcelláinak felosztása, az alkalmazott dózisok megjelölésével

3.2.3. A talajminták előkészítése

A talajok előkészítésére a biológiai tesztek előtt ultrahangos oldószeres extrakciót alkalmaztunk. A talajminták feldolgozását folyadék-folyadék extrakciós eljárásban végeztük. A földmintákat az előkészítés előtt kíméletesen légszárazzá szárítottuk. Tíz g légszáraz talajmintához 15 ml hexán:aceton (1:1) oldószerkeletet adtunk. 5 perc manuális rázást követően 20 percig ultrahangos kezelésnek vetettük alá a mintákat, majd 4000/perc fordulaton, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk őket. A felülúszó 10 ml-ét 15 µl HCl-al savanyítottuk, majd kíméletesen szárazra pároltuk N₂ gáz árama alatt (Maloschik et al., 2010). A mintákat a további felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A talajminták előkészítése során a 10 g légszáraz mintából az oldószerrel történő kioldás és a vákuumos bepárlást követő visszaoldás után végül 1 ml oldott extraktumot kaptunk.

A minták elemzésére a mutagenitás tesztek elvégzése előtt kvalitatív vizsgálatok segítségével is sor került, a gázkromatográfiás mérésekkel a földmintákban a növényvédő szer maradékok jelenlétét igazoltuk.

A talajextraktumokat a comet testben történő felhasználás előtt 1 ml MEM-ben oldottuk fel, majd 1 órán át szonikáltuk. A mintát két egyenlő részre osztottuk, majd mindkettőhöz további 0,5 ml MEM-et adtunk hozzá. Az *Allium cepa* teszt során 1 ml desztillált vizet adtunk az extraktumhoz, majd egy órás szonikálást követően csapvízzel 1 l-re hígítottuk.

3.3. Az alkalmazott mutagenitási tesztek módszerei

3.3.1. *Allium cepa* teszt (cito- és genotoxicitás vizsgálat)

A teszthez közönséges vöröshagymát (*Allium cepa*) használtunk. A vizsgálatokhoz 3-4 g-os, 15-20 mm átmérőjű hagymákat használtunk, melyeket a kezelés előtt 4 °C-on, sötétben és száraz körülmények között tároltunk. A teszt megkezdésekor eltávolítottuk a külső száraz sárga burokleveleket.

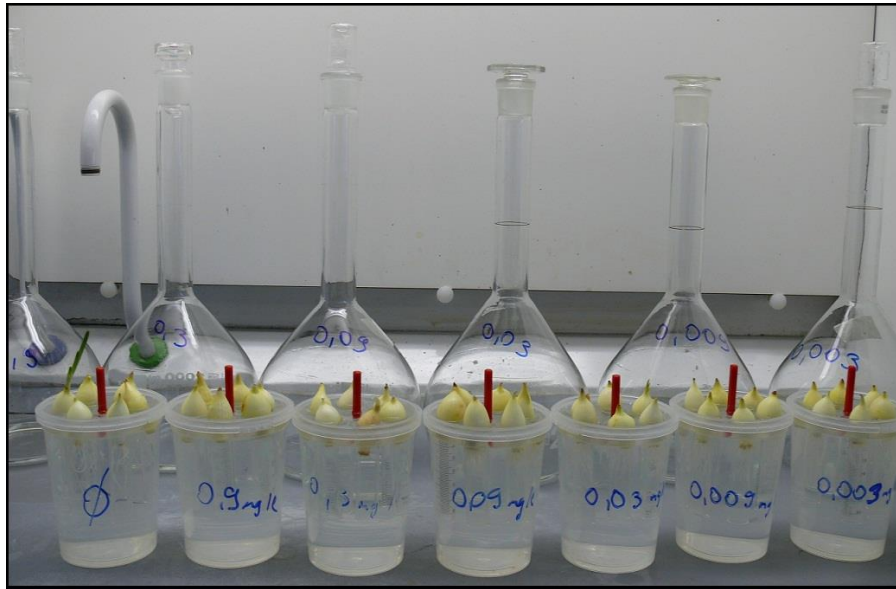
3.3.1.1. Az effektív koncentráció (EC) meghatározása

Az EC_{50} értékek és a mutagenitás teszthez felhasználandó dózisok meghatározásához elsőként toxicitás tesztet végeztünk. A toxicitás mértékét Fiskesjö (1985) nyomán a vizsgált növényvédő szerek, illetve hatóanyagok növekedést gátló hatása alapján határoztuk meg. A hagymákat a vizsgálandó anyagok eltérő töménységű koncentrációival kezeltük, 5-8 dózist alkalmazva 0,1 µg- 10 mg-os nagyságrendben (8. ábra). A teszt segítségével elvégeztünk két, fenoxi-alkán-karbonsav herbicid, a Dezormon és az Optica trió, valamint hatóanyagaik és azok keverékének vizsgálatát, továbbá vizsgáltuk az előzetesen Optica trióval kezelt, tenyészedényes kísérletből származó talajmintákat is.

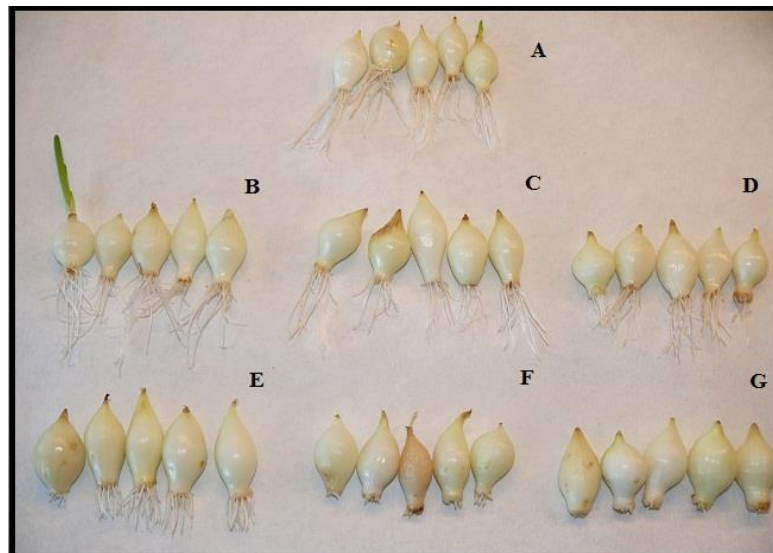
A vizsgálandó anyagokat csapvízben oldottuk fel, negatív kontrollként csapvizet alkalmaztunk. A kezelés 96 órán át tartott, erre az időre a hagymákat egyesével csövekbe helyeztük, majd a csöveket 0,5 l-es poharakba állítottuk, melyeket a megfelelő koncentrációjú vizes oldattal töltöttünk fel. Egy pohárba 6 db cső került, azaz egy-egy dózis toxicitásáról 6 hagyma gyökerének növekedési adatai szolgáltattak információkat. Az oldatokat 24 óránként frissre cseréltük, majd 96 óra elteltével megmértük a gyökerek növekedését (9. ábra). A leggyengébben fejlődő gyökerű hagymát kizártuk, az öt további növekedéséből átlagot számoltunk. A különböző dózisok átlagai alapján nem-lineáris regressziót alkalmazva kiszámoltuk az EC_{50} , EC_{45} , EC_{30} és EC_{15} értékeket.

Az *Allium cepa* teszt első lépéseként elvégzett gyökérszőr növekedésének vizsgálata kettős célt szolgál. Egyrészt önmagában is releváns adatokat szolgáltat a vizsgált anyagok esetleges citotoxikus, növekedés gátló hatásairól, másrészt a teszt második lépéseként elvégzett mutagenitási vizsgálatokhoz is elengedhetetlenül szükséges, mivel a gyökérszörök növekedése alapján számítható ki az adott anyag effektív koncentrációja. A második lépésben elvégzett mutagenitás vizsgálat során

célunk, hogy ne a toxikus, hanem az esetlegesen fellépő mutagén hatásokat vizsgáljuk, ezért feltétlenül szükséges az EC_{50} -nél alacsonyabb koncentrációk pontos meghatározása.



8. ábra. Az *Allium cepa* teszt kivitelezése (fotó: Bokán)



9. ábra. MCPA effektív koncentrációjának meghatározása *Allium cepa* tesztben. A hagymák 96 órás kezelést követően az alkalmazott dózisnak megfelelően: A: kezeletlen kontroll, B: 0,0001 mg/l, C: 0,001 mg/l, D: 0,01 mg/l, E: 0,1 mg/l, F: 1 mg/l, G: 10 mg/l (fotó: Bokán)

Az adatok értékeléséhez 4 paraméteres logisztikus, nem-lineáris regresszió analízist alkalmaztunk az alábbi képlet alapján:

$$F(x) = \frac{A - D}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} + D$$

ahol

A- alsó aszimptota

B- görbe meredeksége

C- inflektációs pont

D- felső aszimptota (Reiczigel és mtsai, 2010).

A gyökerek átlagos hossza közötti szignifikáns különbségeket variancia analízissel (egyutas ANOVA) állapítottuk meg, a post-hoc tesztet Bonferroni korrekcióval végeztük.

Az effektív koncentráció értékeinek meghatározása mellett rögzítettük az esetleges morfológiai elváltozásokat is.

3.3.1.2. Kromoszóma aberrációs teszt

A teszt megkezdése előtt ez esetben is eltávolítottuk a hagymák külső, száraz burokleveleit és a primordiát. A hagymákat először 24 órára csapvízbe helyeztük, majd további 48 órára a toxicitás tesztben meghatározott értékek alapján EC₄₅, EC₃₀ és EC₁₅ dózisokat alkalmaztunk a hagymák kezelésére a vizsgálandó hatóanyagok oldatából (Rank és Nielsen, 1997). Pozitív kontrollként 5 mg/l-es maleinsav-hidrazidot, negatív kontrollként csapvizet alkalmaztunk. A vizsgálandó anyagokat, melyek megegyeznek az *Allium cepa* toxicitási tesztben vizsgáltakkal, ez esetben is csapvízben oldottuk fel, dózisonként hat hagymát helyeztünk az oldatba, majd a teszt végén minden dózisban a leggyengébb növekedési eredményt mutatót kizártuk, a maradék ötöt pedig előkészítettük a további vizsgálatokhoz (Barbério és mtsai, 2011). Ehhez hagymánként 5 gyökér csúcsának aktív növekedési zónájából az utolsó néhány mm-t levágtuk, és 5 percre 50 °C-ra melegített, 9 rész 45%-os ecetsav és egy rész 1 M-os HCl-ből készített oldatba helyeztük, hogy feloldjuk a sejtfalakat. Ezután a gyökércsúcsokból 2%, 45%-os ecetsavban oldott orcein felhasználásával készítettünk kenetet (Nielsen és Rank, 1994). Hagymánként egy metszetet készítettünk. Az így elkészült metszetek -20 °C-on 2

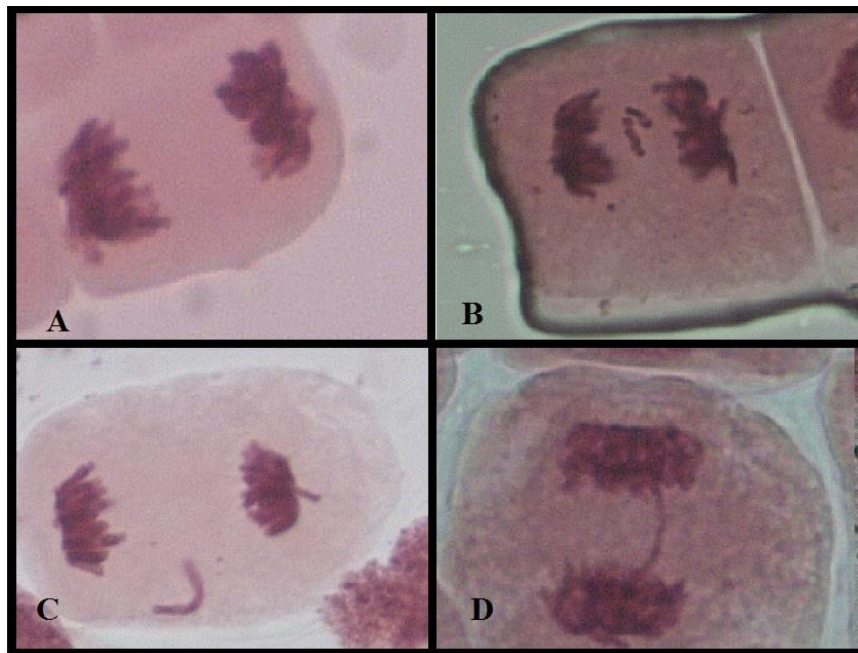
hónapig voltak tárolhatóak.

A metszeteket kód alapján, vakon vizsgáltuk. A mikroszkópos vizsgálatok során meghatároztuk a mitotikus indexet (MI) és kromoszómális elváltozások (CA) arányát a késői anafázisban és korai telofázisban lévő sejtek esetében.

A mitotikus indexet 1000 sejt esetén a mitózis bármely fázisában lévő sejtek számából határoztuk meg. Ha a mitotikus index 10 vagy annál kevesebb volt, az adott hagyma növekedése túl gyengének bizonyult, ezért kizártuk a további vizsgálatokból. A kromoszómális elváltozások elemzéséhez metszetenként 100 ana- vagy telofázisban lévő sejtet vizsgáltunk, azaz dózisonként 500 sejtet összesen. A következő rendellenességeket állapítottuk meg és rögzítettük: hidak, kromoszóma fragmentumok és teljes önálló kromoszómák (Rank és Nielsen, 1993) (10. ábra).

3.3.1.3. Az alkalmazott statisztika

A sejtek kromoszóma aberrációjának statisztikai értékelését χ^2 próbával végeztük, a mitotikus indexeket t-próbával hasonlítottuk össze. A számított effektív koncentráció értékeit a koncentráció-addíciós modell segítségével kalkuláltuk ki (Loewe és Muischnek, 1926; Tichý és mtsai, 2002).



10. ábra. Az *Allium cepa* teszt során vizsgált kromoszóma-rendellenességek. **A:** normál telofázis; **B:** fragmentumok; **C:** kromoszóma törés; **D:** híd (fotó: Bokán)

3.3.2. MTT teszt

A kolorimetriás citotoxicitási teszt segítségével a 2,4-D, MCPA, mekoprop-P és diklorprop-P hatóanyagok potenciális toxicitásának mértékét vizsgáltuk EPC halsejteken. A hatóanyagok egyedi vizsgálata mellett elvégeztük azok ternáris keverékben történő vizsgálatát is, melyet az MCPA, a mekoprop-P és diklorprop-P 1:1:1 tömegarányú keverékéből készítettünk.

3.3.2.1. Halsejtek kezelése

A ponty (*Cyprinus carpio* L.) epitheliális tumorból eredő “*Epithelioma papulosum cyprini*” (EPC) halsejt tenyészet a Dán Állatorvosi Egyetemről származik. A sejtvonalat 1969 óta tartják fent, és széles körben használják halvírusok diagnosztikájában valamint genotoxikológiai vizsgálatok során. Kariotípusa $2n=96$. A sejtvonalt nagy előnye, hogy széles hőmérsékleti skálán, 15-33 °C-on tenyészthető. Tenyésztéséhez 5% légköri CO₂ szükséges (Fijan és mtsai, 1983).

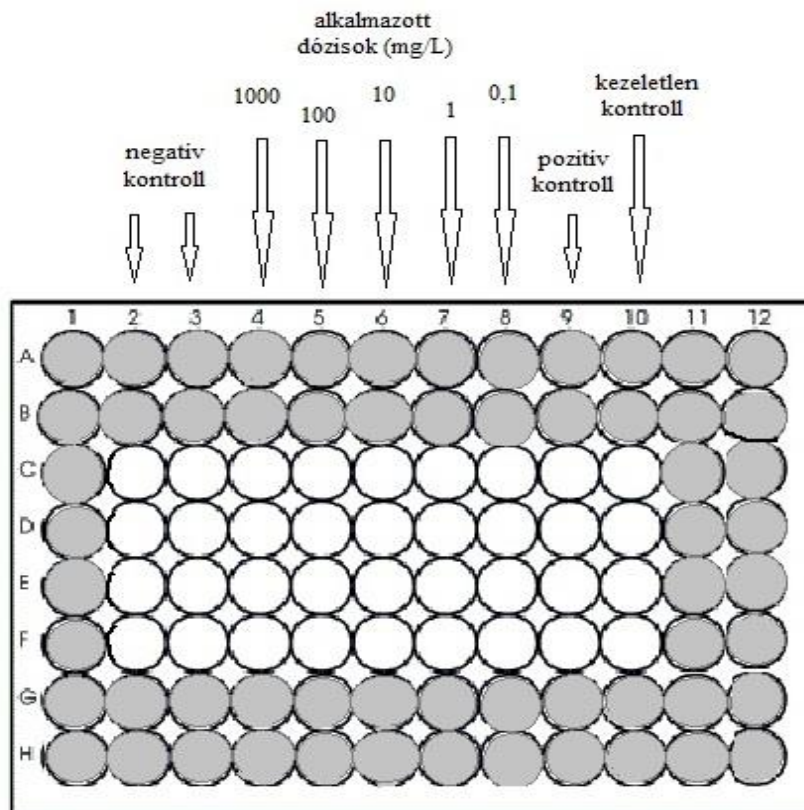
A sejt kultúrát 25 ml-es műanyag edényekben tenyésztettük minimál esszenciális médiumban (MEM) 10% foetális borjú szérumban (fetal calf serum, FCS) és 1% penicillin hozzáadásával (Babich és Borenfreund 1991).

A vizsgálatok előtt a sejteket -80 °C-on tároltuk (Azqueta és mtsai 2011). A sejteket a mélyfagyasztás előtt tripszinnel átmostuk, majd MEM hozzáadásával lecentrifugáltuk (10 min, 1050 rpm, 4 °C). Ezután a felülúszót leöntve a sejteket FCS-ban oldottuk vissza. A szuszpenzió 0,5 ml-ét vegyítettük 20% DMSO, 70% tris stabilizált MEM és 10% FCS 0,5 ml-nyi keverékével, majd crio csövekben -80°C-ra fagyasztottuk le.

A vizsgálatok elvégzésekor 0,5 ml, 10% FCS-t és 1% penicillint tartalmazó tris stabilizált MEM-et adtunk a fagyasztott sejtekhez, és kíméletesen szobahőmérsékletre olvasztottuk őket. További 3,5 ml MEM oldat hozzáadása után lecentrifugáltuk a sejteket (10 min, 260 rpm, 15 °C). Ezt a sejteket foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS) történő mosása és újbóli lecentrifugálása követte (5 min, 400 rpm, 15 °C). A felülúszó elöntése után a sejteket MEM oldatban oldottuk vissza. Az oldat mennyiségét a sejtszám határozta meg, a cél az volt, hogy körülbelül 75000 db/ml sejtet tartalmazzon a szuszpenzió.

3.3.2.2.MTT teszt kivitelezése

96 lyukú mikrotálca bemélyedéseibe 100 µl sejtszuszpenziót pipettáztunk, majd 28 °C-on inkubáltuk 24 órán át. A tálca külső soraiba (A, B, G, H, 1, 12) nem kerültek sejtek, elkerülve azok esetleges kiszáradását (11. ábra). Ezt követően a sejtekre mértünk 100 µl-t a vizsgálandó anyagból. Vizsgálatonként 5 dózist alkalmaztunk, dózisonként 4 ismétléssel, az expozíciós idő 24 óra volt. Pozitív kontrollként 100 µl nátrium-kalcium-dikromátot alkalmaztunk, a negatív kontroll PBS volt. A 24 órás inkubálást követően a sejtekről kíméletesen előntöttük a folyadékot, és 30 µl MTT-t pipettáztunk rájuk, majd 28°C-on 4 órát inkubáltuk. A folyadék eltávolítása után 200 µl DMSO-t adtunk a sejtekhez, és 15 sec rázatás után 20 percen át inkubáltuk őket. Az abszorbancia mértékét 570 nm-en mértük Thermo Scientific Multiscan FC típusú spektrofotométer segítségével.



11. ábra. 96 lyukú mikrotálca elrendezése az MTT vizsgálatok során.

3.3.2.3. Alkalmazott statisztika

A statisztikai analízist egy utas anovával, a post hoc tesztet Fisher tesztel végeztük, statisztikai próba eredményét $p < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

3.3.3. EPC comet teszt

3.3.3.1. Sejtvonal és a sejtek kezelése

A kísérletekhez ponty (*Cyprinus carpio*) epitheliális tumorból eredő "Epithelioma papulosum cyprini" (EPC) halsejteket használtam fel. A sejtkultúrát 25 ml-es műanyag edényekben tenyésztettük minimál esszenciális médiumban (MEM) 10% FCS (fetal calf serum, foetális borjú szérum) és 1% penicillin hozzáadásával (Babich és Borenfreund, 1991a).

A vizsgálatokat -80 °C-ra fagyasztott sejtekkel végeztük (Azqueta és mtsai, 2011). A sejteket a mélyfagyasztás előtt tripszinnel átmostuk, majd MEM hozzáadásával lecentrifugáltuk (10 min, 1050 rpm, 4 °C). Ezután a felülúszót leöntve a sejteket FCS-ban oldottuk vissza. A szuszpenzió 0,5 ml-ét vegyítettük 20% DMSO, 70% tris stabilizált MEM és 10% FCS 0,5 ml-nyi keverékével, majd crio csövekben -80 °C-ra fagyasztottuk le.

A sejtek életképességét a tripánkék eljárással vizsgáltuk minden esetben. Az eljárás lényege, hogy a tripánkék festék csak az elhalt sejtek citoplazmájába képes behatolni és citoplazma fehérjékhez kötődni, mivel az élő sejtek membránja nem ereszti át a festéket, így az elhalt sejtek mikroszkópos nagyításban könnyen detektálhatóak (Wilson és mtsai, 1969). Amennyiben az élő sejtek aránya alacsonyabb volt 95%-nál, az adott sejtkultúrát kizártuk a kísérletekből.

A teszt segítségével elvégeztük két, fenoxi-alkán-karbonsav herbicid, a Dezormon és az Optica trió, valamint hatóanyagaik és azok keverékének vizsgálatát, továbbá vizsgáltuk az előzetesen Optica trióval kezelt, tenyészedenyes és szabadföldi kísérletekből származó talajmintákat is.

A vizsgálni kívánt hatóanyagokat, növényvédő szereket és talajmintákat MEM-ben vittük szuszpenzióba. A vizsgálatokhoz -80 °C-on tárolt, közvetlenül a kezeléseik előtt kíméletesen kiolvasztott sejteket használtunk minden esetben, kivéve a tripszin hatásának vizsgálatánál. A vizsgálatok elvégzésekor 0,5 ml, 10% FCS-t és 1% penicillint tartalmazó MEM-ot adtunk a fagyasztott sejtekhez, és kíméletesen szobahőmérsékletűre olvasztottuk őket. Az olvasztást a sejtek foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS) történő mosása és újbóli lecentrifugálása követte (5 min, 400 rpm, 15 °C). MEM-ben történő visszaoldásuk után a sejtek készen álltak a vizsgálandó anyaggal való kezelésre.

Kb. 10^5 sejtet tartalmazó szuszpenzióhoz hozzáadtunk 1 ml-t a vizsgálandó anyagból. Vizsgálatonként 5 dózist alkalmaztunk. A kezelés 24 órás volt, a sejteket ez idő alatt $15\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Pozitív kontrollként 1 mM-os hidrogén-peroxidot alkalmaztunk 15 percig. A kezeletlen kontrollban a sejteket MEM-ben oldottuk fel.

Az EPC comet teszt megfelelő tesztkörülmenyeinek vizsgálatai során rendre megváltoztattunk néhány paramétert az alábbiak szerint:

Az expozíciós idők hatásának vizsgálatokor a kezeletlen kontroll, illetve pozitív kontroll sejteket 24 órára inkubáltuk $15\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Egy másik, párhuzamos vizsgálatban a sejteket a közvetlenül a pozitív kontrollal történő kezelés után, illetve ennek hiányában, a negatív kontrollban (MEM-ben) történő feloldást követően vetettük alá a gélelektroforézisnek (0 órás kezelés).

Ismert a comet tesztnek egy mikrotálcán végzett változata is (Kiskinis és mtsai, 2002), melyben eppendorf cső helyett 24 lyukú mikrotiter tálcán inkubálják a sejteket. A megfelelő tenyészedény kiválasztásának vizsgálata során a sejteket minden esetben 24 órán át inkubáltuk eppendorf csőben, illetve 24 lyukú felületkezelte mikrotálcán.

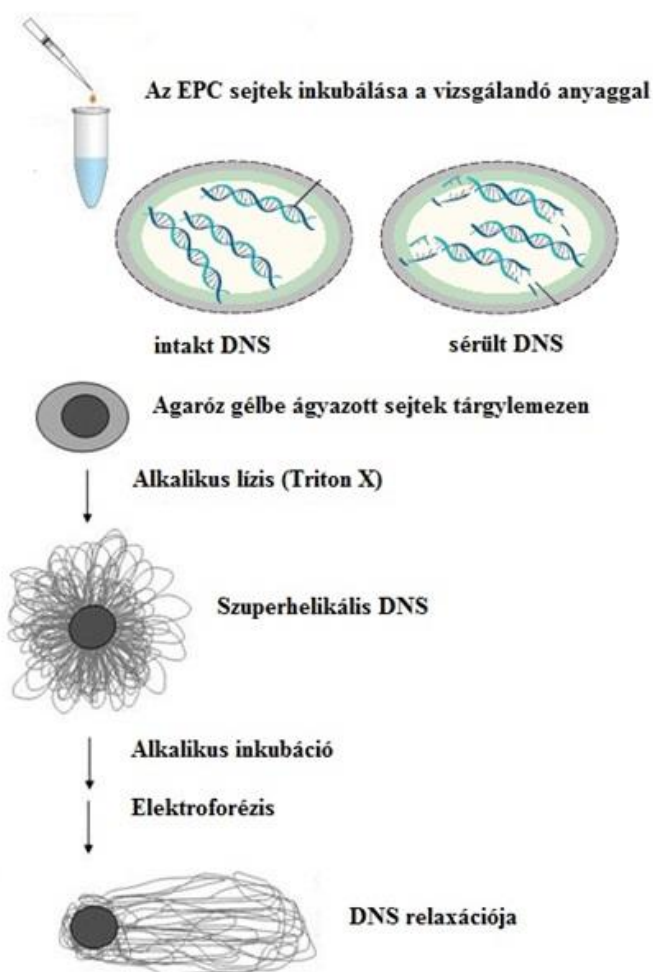
A szuszpenziók hatásának vizsgálatokor PBS:MEM 1:1 arányú keverékét is alkalmaztuk párhuzamos vizsgálatban.. A kezelés végén a sejteket minden esetben PBS-ben mostuk le, majd lecentrifugáltuk.

A tripszin hatásának vizsgálatánál a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolt, közvetlenül a kezelésekek előtt kíméletesen kiolvasztott sejtekkel párhuzamosan $15\text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolt, tripszin segítségével disszociáltatott sejteket is vizsgáltunk. Ebben az esetben a 25 ml-es tenyészedényben növesztett sejtek fölül óvatosan, pipetta segítségével eltávolítottuk a MEM-ot, 4 ml tripszin-EDTA keveréket adtunk hozzá, majd 2 perc után 2,5 ml-t lepipettáztunk a keverékből. Ezt követően folyamatos le-fel pipettázással vittük szuszpenzióba a kitapadt sejteket. Az eljárást centrifugázással, majd kétszeres, PBS-ben történő mosással zártuk (Henderson és mtsai, 1998; Kammann és mtsai, 2001).

A fenoxi herbicidek, illetve a talajminta extraktumok vizsgálata során minden esetben fagyasztott, közvetlenül a kezelésekek előtt kíméletesen kiolvasztott sejteket alkalmaztunk, melyeket a kezelésekek után 24 órán át inkubáltunk $15\text{ }^\circ\text{C}$ -on.

3.3.3.2. Comet teszt

A vizsgálatokat Singh és mtsai (1988) által meghatározott protokoll szerint végeztük, kisebb változtatásokkal. A lecentrifugált sejtekről leöntöttük a felüliszót, majd 125 μl 0,8%-os alacsony olvadáspontú agarózzgélét adtunk hozzá. Ebből 100 μl -t az előzetesen 0,8%-os normál olvadáspontú agarózzal bevont tárgylemezre pipettáztunk. 15 perces száradást követően egy harmadik, 0,8%-os alacsony olvadáspontú agaróz réteggel vontuk be a sejteket, majd min. 90 percre lízis pufferbe (2,5 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM TRIS 1% Triton-X) helyeztük a metszeteket 4 °C-on. A szabaddá tett DNS-t 20 perc alkalikus inkubáció után (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) elektroforetízáltuk (300 mA, 28 V, 15 min), mialatt lehetőség volt a DNS relaxációjára. Az elektroforézist követően a sejteket 0,4 M-os Tris-oldattal neutralizáltuk, majd 20 $\mu\text{g/ml}$ -es etídium bromiddal festettük meg (12. ábra).



12. ábra. A comet teszt kivitelezése

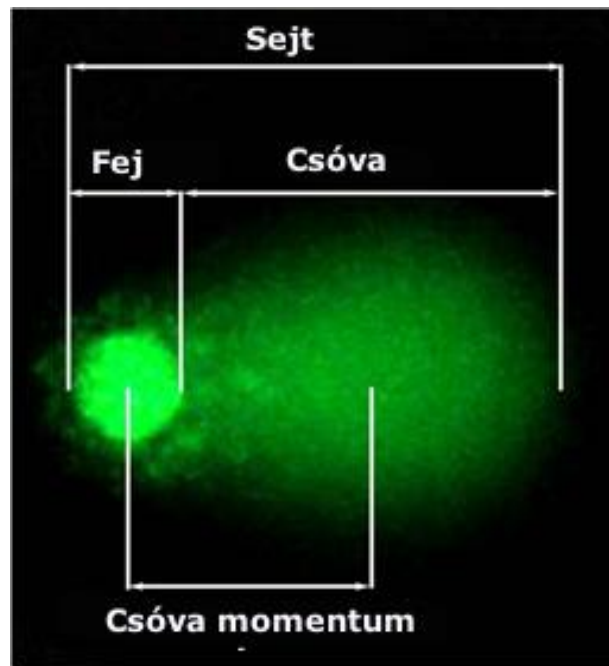
Minden vizsgálatot 3 ismétlésben végeztünk, a metszeteket vakon vizsgáltuk. A sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Dialux, Leica) 400-szoros nagyítással. Minden metszet esetében 50, random módon kiválasztott sejtet vizsgáltunk meg és rögzítettük a paramétereiket a Comet Assay III. képelemző szoftver segítségével. A metszetet átvilágítva a károsodott sejt pontjai különböző mértékben sugározzák ki a fényt. Az áteresztett fény intenzitásának megfelelően a szoftver megalkotja a sejt fekete-fehér árnyalatos ábráját, melyben a pixelek színmélysége megfelel az adott pont DNS-tartalmának (Kumaravel és mtsai, 2009).

A nagyon erősen károsodott sejteket kizártuk a vizsgálatból, mivel ezek egyes paramétere a szoftver mérési tartományán kívül estek, és így esetleg helytelen mérési adatokat szolgáltatott volna (Kumaravel és mtsai, 2009). A sejtek paramétere közül a csóva %-os DNS-tartalmát, a csóvamomentumot és a csóva hosszát rögzítettük.

A paraméterek jelentése a következő:

- A csóva %-os DNS-tartalma: $100 \times \frac{\text{a csóva DNS intenzitása}}{\text{a teljes sejt DNS intenzitása}}$.
- Olive féle csóvamomentum: a fej középtől a csóvaközépig tartó távolság szorozva a csóva %-os DNS-tartalmával.
- A csóva hossza: a DNS migrációja a sejtmagtól számítva (13.ábra).

A paraméterek közül a nemzetközi irodalomban a csóva %-os DNS-tartalmának használata terjedt el leginkább, ezért a vizsgálatok eredményeinek részletes ismertetésekor én is ezt emelem ki (Gedik és Collins, 2005; Kumaravel és mtsai, 2009). Amennyiben a másik két paraméter (csóvamomentumot, csóva hossza) vizsgálatának eredményei megegyeznek a csóva %-os DNS-tartalmának vizsgálatokor kapott eredményekkel, e két utóbbi paraméter részletes elemzésétől eltekintek a disszertációban.



13. ábra. A comet tesztben vizsgált károsodott sejt részei

3.3.3.3. Az alkalmazott statisztika

A statisztikai analízist egy utas ANOVA-val, a post hoc tesztet Bonferroni korrekcióval végeztük, statisztikai próba eredményét $p < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak (Rank és Jensen, 2003; Wiklund és Agurell, 2003).

4. EREDMÉNYEK

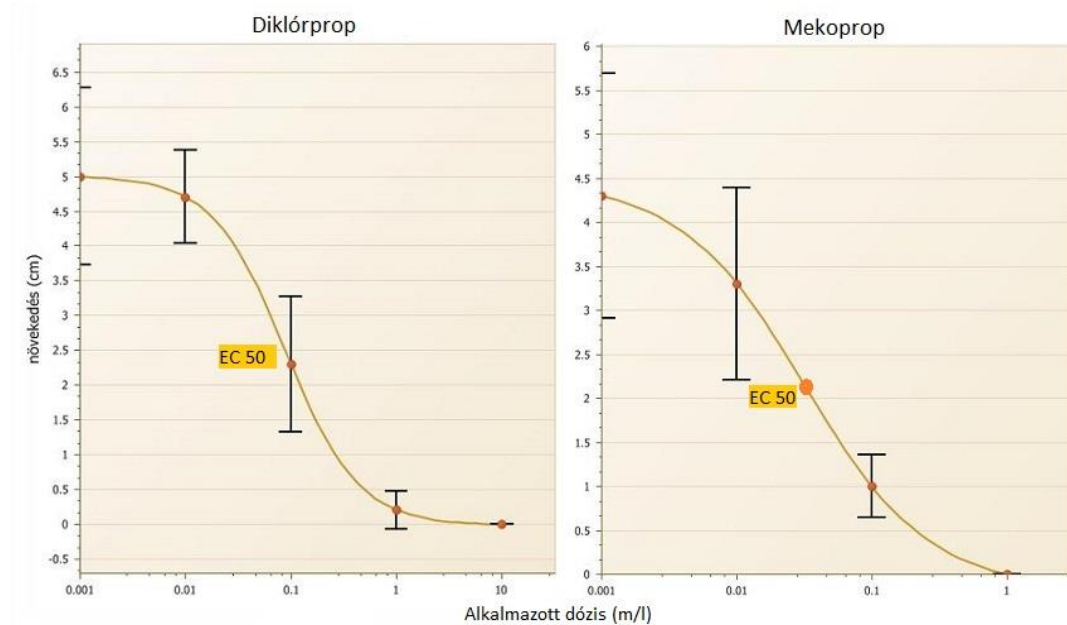
4.1. Az *Allium cepa* teszt vizsgálatainak eredményei

4.1.1. EC₅₀ érték meghatározása az *Allium cepa* tesztben

Az *Allium cepa* teszt első szakaszában megállapítottuk az általunk vizsgált vegyületek EC₅₀ értékét. Ehhez a hagymákat a vizsgált növényvédő szerek, illetve hatóanyagaik vizes oldatába helyeztük, majd rögzítettük a hajszálgyökerek növekedésének mértékét (melléklet, 1. táblázat). Minden esetben nyilvánvaló dózis-dependens gátlás volt kimutatható, a magasabb koncentrációjú oldatokban teljes növekedés gátlás volt megfigyelhető, azaz a gyökérszörök nem fejlődtek (14. ábra). Az alkalmazott dózisok hatásának tartománya átfedte a 0-100% effektív koncentrációkat minden esetben.

A Dezormon, és aktív hatóanyaga, a 2,4-D esetében a megállapított EC₅₀ értékek összhangba hozhatóak: a Dezormon EC₅₀ értéke 0,0582 mg/l, a 2,4-D esetében megállapított EC₅₀ érték pedig 0,0732 mg/l (2. táblázat).

Az Optica trió mért EC₅₀ értéke 0,025 mg/l, míg a kalkulált EC₅₀ érték a koncentráció-addíciós modell szerint 0,064 mg/l, tehát a mért érték a számított érték két és félszerese. Ebben az esetben vélhetőleg szinergisztikus hatások játszhattak közre.



14. ábra. Az effektív koncentráció értékeinek meghatározása nem-lineáris regresszióval a diklorprop-P és mekoprop-P esetében.

2. táblázat. Növényvédő szerek és hatóanyagaik mért és számított effektív koncentráció értékei *Allium cepa* tesztben (mg/l)

	Mért értékek (mg/l)				Számított értékek (mg/l)
	EC ₅₀	EC ₄₅	EC ₃₀	EC ₁₅	EC ₅₀
Dezormon	0,0582	0,0509	0,0415	0,0241	0,0732
Optica trió	0,0258	0,0223	0,0118	0,0046	0,064
2,4-D	0,0732	0,0554	0,0226	0,0066	-
MCPA	0,0563	0,0450	0,0324	0,0207	-
mekoprop-P	0,0363	0,0246	0,0128	0,0052	-
diklórprop-P	0,1109	0,0862	0,0382	0,0125	-
Bináris keverék MCPA-mekoprop-P	0,0737	0,0615	0,0343	0,0154	0,0449
Bináris keverék mekopropP–diklórprop-P	0,0456	0,0408	0,0285	0,0174	0,069
Bináris keverék diklórprop-P– MCPA	0,1138	0,1005	0,0675	0,0391	0,083
Ternáris keverék MCPA-mekoprop-P –diklórprop-P	0,0262	0,0201	0,0083	0,0025	0,064

Elvégeztük az Optica trió aktív hatóanyagainak (MCPA, mekoprop, diklórprop) tesztelését ternáris és bináris keverékekben. A keverékekbe a hatóanyagok az Optica triót alkotó tömegarányuknak megfelelően kerültek. A várható effektív koncentrációkat a koncentráció-addíciós modell segítségével számoltuk, az összetevők egyedi effektív koncentrációs adatait alapul véve.

A bináris keverékek vizsgálatakor a mekoprop-P–diklórprop-P keverékének esetében a mért effektív koncentráció (0,0456) kis mértékben alacsonyabb volt a számítottnál (0,069), ugyanakkor a diklórprop-P–MCPA keverékénél ennek ellenkezőjét tapasztaltuk: a keverék mért EC₅₀ értéke (0,1138 mg/l) magasabb volt a

számított értéknél (0,083 mg/l), hasonlóan az MCPA–mekoprop-P esetében a mért érték 0,0737 mg/l, míg a számított 0,0449 mg/l volt.

A ternáris keverék esetében a számított EC_{50} érték 0,064 mg/l volt, azonban a mért effektív koncentráció ennél sokkal alacsonyabb, 0,0262 mg/l volt. Ez az adat majdnem teljesen megegyezik az Optica trió mért effektív koncentrációjának értékével (0,0258 mg/l). A két komponensből álló diklórprop-P–MCPA mért EC_{50} értéke egy nagyságrenddel nagyobb volt (0,1138 mg/l), mint a hasonló összetételű, de három komponensű ternáris keverék EC_{50} értéke (0,0262 mg/l). Ezen adatok ismeretében elmondható, hogy mind a ternáris keverékben, mind a hatóanyagokat a ternáris keverékkel megegyező arányban tartalmazó Optica trióban szinergisztikus hatások léphetnek fel a három fenoxi-karbonsav között, így együttesen már alacsonyabb dózisban is képesek effektív hatást elérni.

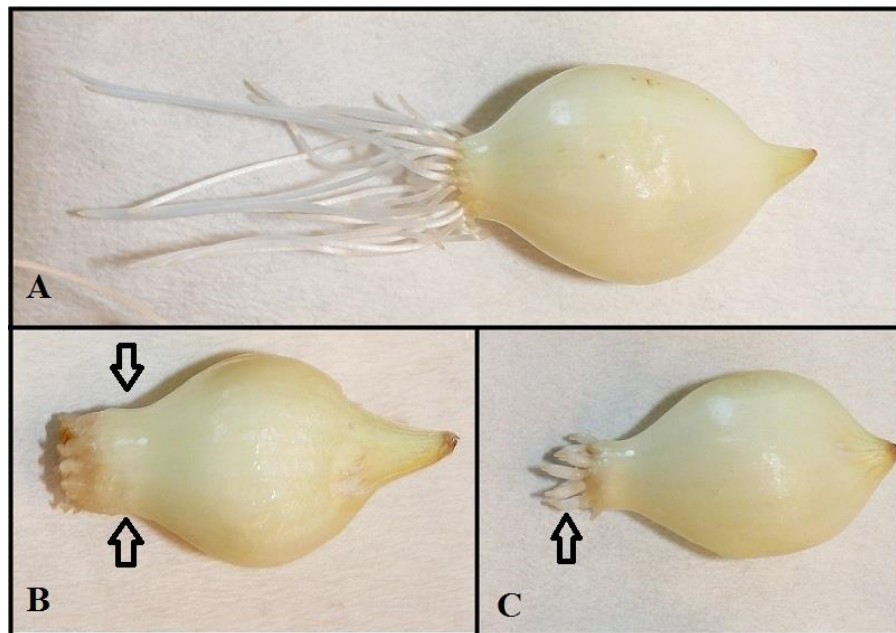
A ternáris keverékben a három hatóanyagot az Optica triót alkotó tömegarányuknak megfelelően kevertük össze. Így tehát a két vizsgált anyag (az Optica trió, illetve a ternáris keverék) közötti különbséget az Optica trióban a 3 hatóanyagon kívül található egyéb, ún. vivőanyagok adták. A vizsgálatok eredményei szerint a ternáris keverék EC_{50} értéke majdnem teljesen megegyezik az Optica trió mért EC_{50} értékével. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az *Allium cepa* tesztben vizsgálható citotoxikus hatásokért a hatóanyagok felelősek, hiszen ha a vivőanyagoknak is lenne ilyen hatásuk, úgy az módosította volna a ternáris keverék EC_{50} értékét az Optica trió EC_{50} értékéhez képest.

4.1.2. Morfológiai elváltozások vizsgálata az *Allium cepa* tesztben

A hajszálgökerek növekedésének mértékén túl rögzítettük az egyéb megfigyelhető morfológiai elváltozásokat is.

A 2,4-D, az MCPA, a Dezormon és az Optica trió magasabb koncentrációinak esetében megfigyelhető volt a gyökérnövekedés gátlásán kívül a hagymatönk megnyúlása és a sejtek rendellenes, ún. C-mitózis osztdására utaló tumoros elváltozása is.

A magas koncentrációknál, mielőtt fellépett volna a teljes citotoxikus hatás, minden esetben megfigyelhető volt a deformált, fejletlen, csupán 1-2 mm-esre megnövő gyökérször megjelenése. Ebben az esetben a gyökérszörök száma redukált volt, a kontrollban átlagosan megjelenő 20-30 gyökérször helyett a magas koncentrációjú kezeléseknél 5-10 gyökérkezdemény volt csupán megfigyelhető, a néhány mm-esre megnövő szörök duzzadtak és törékenyek voltak (15. ábra).



15. ábra. *Allium cepa* morfológiai elváltozásai MCPA hatóanyaggal történő 96 órás kezelést követően. **A:** kezeletlen kontroll, **B:** a tönk megnyúlása és **C:** deformált, fejletlen gyökérször megjelenése detektálható 10 mg/l-es dózis alkalmazása esetén (fotó: Bokán)

4.1.3. Mutációs hatások meghatározása az *Allium cepa* tesztben

4.1.3.1. Fenoxi herbicidek és hatóanyagaik mutagén hatásának vizsgálata az *Allium cepa* tesztben

A 2,4-D hatóanyag vizsgálatokor enyhe hatást észleltünk a kromoszómális aberrációk tekintetében: a vizes kontrollban a kromoszóma aberráció 1,2%, míg a 2,4-D-vel kezelt mintákban 2,8% volt. Ez az érték – a többi hatóanyag vizsgálatánál tapasztaltnal ellentétben– nem mutatott dózis-hatás összefüggést, az összes általunk

vizsgált koncentrációnál (0,007; 0,03; 0,06 mg/l) ugyanazt az értéket mutatta. A mitotikus osztódásban lévő sejtek száma (MI) ugyanakkor a legmagasabb vizsgált koncentrációnál kis mértékben csökkent (3. táblázat).

3. táblázat. 2,4-D mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje ($P < 0,05$)

2,4-D, mg/l	Mitotikus index (\pm SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	51,75 (\pm 6,17)	500	3	3	0	0	6	1,2%
MH	31,8 (\pm 5,55)	500	15	75	15	37	142***	28,4%
0,007	60,6 (\pm 12,40)	500	1	8	0	5	14	2,8%
0,03	65,4 (\pm 17,88)	500	4	5	1	4	14	2,8%
0,06	47,8 (\pm 8,67)	500	5	6	1	2	14	2,8%

A diklórprop, mekoprop és MCPA hatóanyagok vizsgálatai során egymáshoz hasonló eredményeket kaptunk mind a mitotikus index, mind a kromoszóma aberrációk tekintetében. A három vizsgált hatóanyag egyike sem okozott szignifikánsan több kromoszóma aberrációt a kezeletlen kontrollhoz képest. A mitotikus index tekintetében megfigyelhető ugyan az egyértelmű csökkenő tendencia, vagyis a dózisok emelésével a mitotikus osztódások száma csökkent, de a különbséget nem találtuk szignifikánsnak (4., 5., 6. táblázat).

4. táblázat. Diklórprop mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje (P <0,05)

Diklórprop, mg/l	Mitotikus index (±SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	50,4 (± 10,7)	500	0	4	0	0	4	0,8%
MH	31,6 (±6,73)	500	14	43	6	20	83***	16,6%
0,01	44,2(± 8,01)	500	0	3	1	1	5	1%
0,04	51,4 (± 6,38)	500	3	2	1	1	7	1,4%
0,08	39,2 (±9,36)	500	3	2	3	3	11	2,2%

5. táblázat. Mekoprop mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje (P <0,05)

Mekoprop, mg/l	Mitotikus index (±SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	52,5 (±9,33)	500	1	2	0	0	3	0,6%
MH	45,5 (±9,15)	500	33	41	17	11	102***	20,4%
0,005	55,25 (±7,63)	500	1	3	0	0	4	0,8%
0,01	60 (±14,02)	500	4	4	0	2	10	2%
0,03	54,75 (±16,32)	500	2	1	0	0	3	0,6%

6. táblázat. MCPA mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje (P <0,05)

MCPA, mg/l	Mitotikus index (±SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	59,2 (± 12,7)	500	1	2	1	0	4	0,8%
MH	42 (± 8,37)	500	11	33	2	9	55***	11%
0,02	60,6 (± 12,40)	500	2	4	1	0	7	1,4%
0,03	65,4 (± 17,88)	500	1	1	0	0	2	0,4%
0,05	47,8 (±8,67)	500	1	0	1	2	4	0,8%

A ternáris keverék vizsgálatok az egyedi hatóanyagoknál tapasztaltnál nagyobb arányú kromoszóma aberrációt találtunk: a 0,02 mg/l hatóanyagot tartalmazó keverék esetében az aberrált kromoszómák aránya elérte a 4%-ot. Mivel a hatóanyagok egyenkénti vizsgálatánál nem tapasztaltunk ilyen mértékű következményt, feltételezhető, hogy szinergisztikus hatások léptek fel (7. táblázat).

A mitotikus index értékének alakulásában gyenge dózis-hatás volt megfigyelhető: a hatóanyagok növekvő koncentrációjával kis mértékben csökkent a mitotikusan osztódó sejtek száma.

7. táblázat. Keverék mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje ($P < 0,05$)

Ternáris keverék, mg/l	Mitotikus index (\pm SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	46,4 (\pm 7,53)	500	2	0	0	4	6	1,2%
MH	36,6 (\pm 5,72)	500	13	37	19	22	91***	18,2%
0,003	50,4(\pm 24,6)	500	3	2	5	0	10	2%
0,008	44 (\pm 11,04)	500	3	2	6	4	15*	3%
0,02	38,8 (\pm 9,01)	500	2	10	4	4	20***	4%

Végezetül megvizsgáltuk a Dezormon és Optica trió növényvédő szereket is *Allium cepa* tesztben. Az előzetesen megvizsgált hatóanyagok hatásaival összehasonlítva, ám a ternáris keverék eredményétől eltérően az Optica trió nem mutatott szignifikáns mértékű kromoszóma aberrációs hatásokat, és a mitotikus osztódások számát sem csökkentette. A Dezormon vizsgálatokor kismértékű, de nem szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a mitotikus osztódások terén. Elmondható, hogy az általunk vizsgált két növényvédő szer nem mutagén az *Allium cepa* tesztben (8., 9. táblázat).

8. táblázat. Dezormon mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje (P <0,05)

Dezormon mg/l	Mitotikus index (±SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	54,8 (± 17,59)	500	1	4	1	0	6	1,2%
MH	34,4 (± 7,23)	500	11	23	7	17	58***	11,6%
0,02	37 (± 7,34)	500	0	0	1	1	2	0,4%
0,035	31,4 (± 14,88)	500	1	1	0	3	5	1%
0,05	40,2 (±8,07)	500	0	5	2	1	8	1,6%

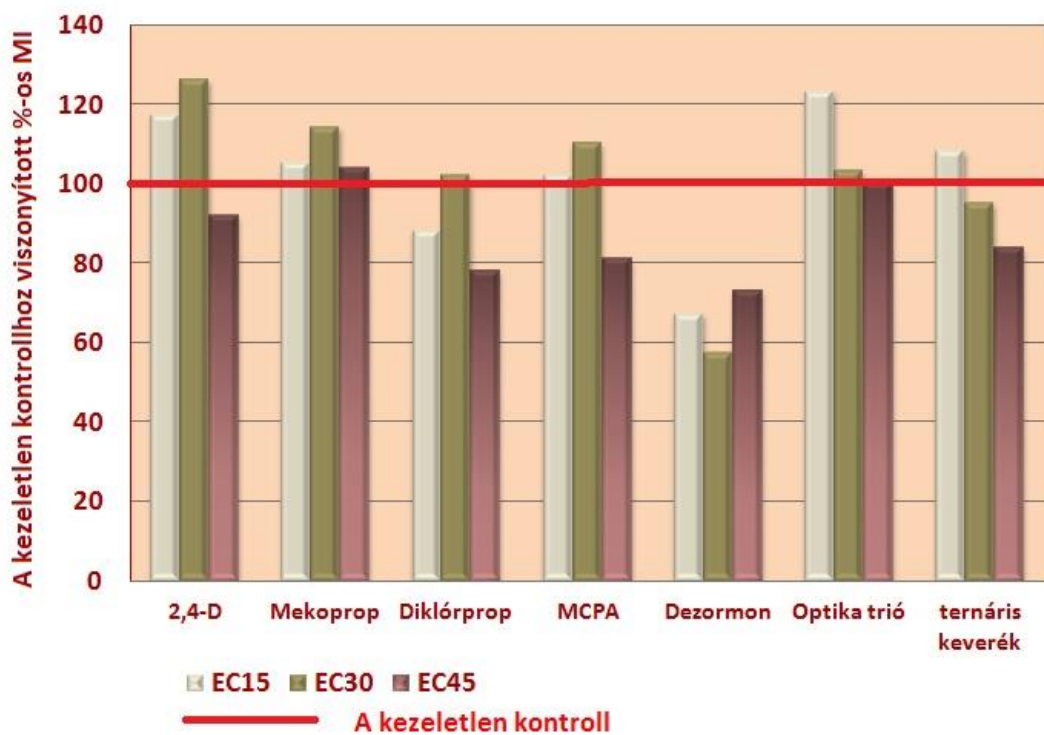
9. táblázat. Optica trió mutagén hatásai *Allium cepa* tesztben, zárójelben a standard hiba értéke, CA: kromoszóma aberráció, MH: maleinsav-hidrazid (pozitív kontroll), ***: szignifikancia szintje (P <0,05)

Optica trió, mg/l	Mitotikus index (±SD)	Vizsgált sejtek száma	Híd	Fragment	Híd+ Fragment	Önálló kromoszóma	Összes aberrált sejt	Totál CA %
kontroll	55.8 (±19,40)	500	1	5	0	0	6	1,2%
MH	41.2 (±16,77)	500	4	41	5	20	70***	14%
0,005	68.8 (±21,84)	500	1	1	0	0	2	0,4%
0,01	58 (±20,20)	500	0	3	0	1	4	0,8%
0,02	55.5 (±11,36)	500	2	1	0	0	3	0,6%

A vizsgálatok eredményeivel kapcsolatban megállapítható mind a növényvédő szerek, mind hatóanyagaik kapcsán, hogy az okozott kromoszóma aberrációk detektált típusainak megjelenésében nem találtunk összefüggéseket. Mind a négy, általunk vizsgált kategória (hidak, kromoszóma fragmentumok, ezek együttes megjelenése, valamint teljes önálló kromoszómák) megjelenését rögzítettük minden beállítás esetében. A kromoszóma aberrációk típusainak eloszlása látszólag random volt. A hidak

és kromoszóma fragmentumok létrejöttét a letört kromoszóma vagy kromatida darabok okozhatják, míg az önálló kromoszómák létrejöttéért gyenge C-mitotikus hatás tehető felelőssé.

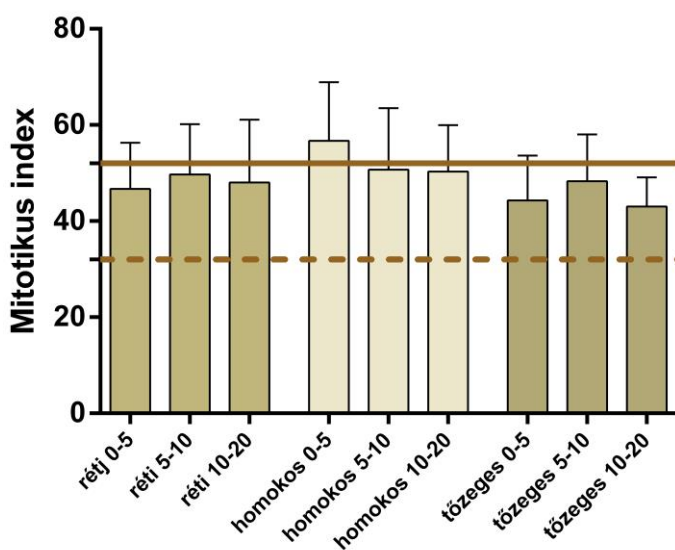
Az auxin hatású növényvédő szerek és hatóanyagaik mitotikus index értékének alakulásában szinte minden esetben gyenge dózis-hatás volt megfigyelhető, vagyis a hatóanyagok növekvő koncentrációjával szemben kis mértékben csökkent a mitotikusan osztódó sejtek száma (16. ábra).



16. ábra. Fenoxi-alkán-karbonsav növényvédő szerek és hatóanyagaik mitotikus indexe (MI) *Allium cepa* tesztben

4.1.3.2. Talajextraktumok mutagén hatásának vizsgálata az *Allium cepa* tesztben

Megvizsgáltunk három, előzetesen Optica trióval kezelt talaj extraktumait is. A mintákat a kezelési után 3. napon vettük. Az *Allium cepa* teszt eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált talajok extraktumai nem okoztak kromoszóma mutációt a hagymasejtekben. Sem a mitotikus index, sem a kromoszóma aberráció értéke nem tért el szignifikánsan a kezeletlen kontrolltól egyik talajextraktum egyetlen mintája esetében sem (17. ábra). Mivel az Optica trióval kezelt hagymasejtek sem mutattak szignifikáns genotoxikus hatást, ez az eredmény nem meglepő. Ugyanakkor az esetleges hatás elmaradását az is okozhatta, hogy a növényvédő szerrel kezelt talajokból elsőként extraktumot készítettünk, majd az *Allium cepa* teszt során ezt az extraktumot hígítottuk vissza. Elképzelhető, hogy a kapott hígítás nem reprezentálta teljes mértékben a kezelt talaj hatásait.



17. ábra. Réti, homokos, és tőzegeges talajok kivonatainak mitotikus indexe *Allium cepa* tesztben. Az egyenes vonal a negatív kontroll (52), szaggatott vonal a pozitív kontroll (32) mitotikus indexének értékét jelzi.

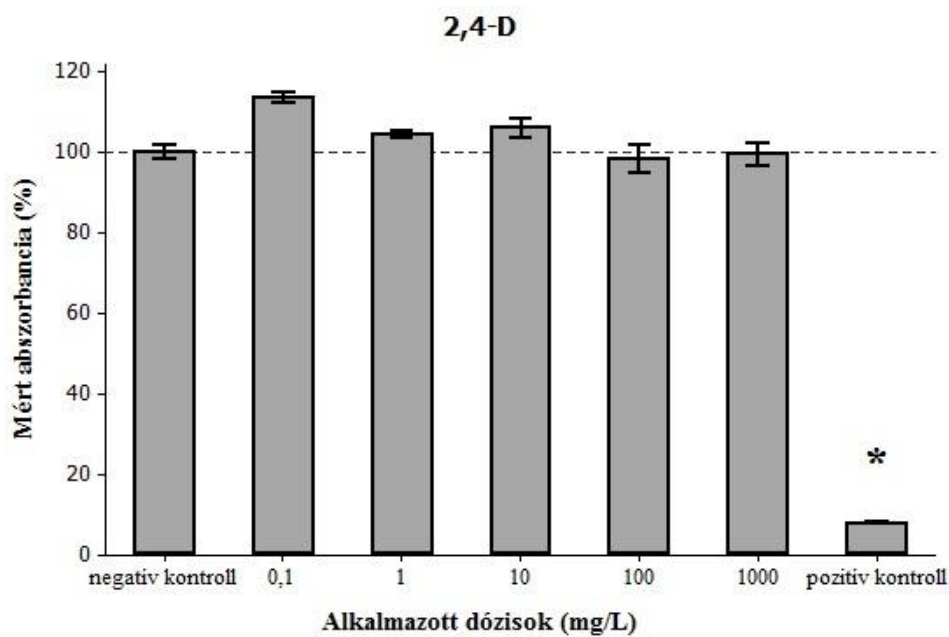
4.2. Az MTT teszt vizsgálatának eredményei

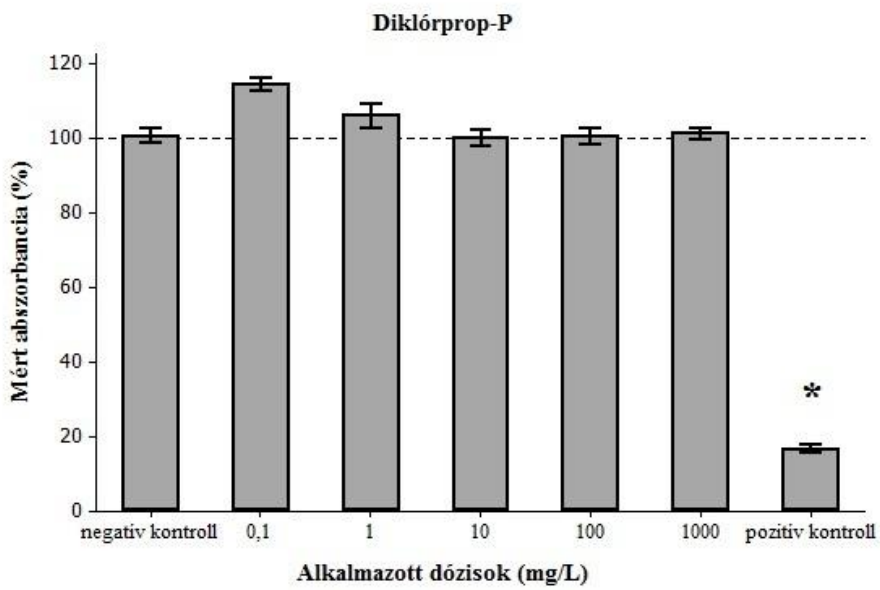
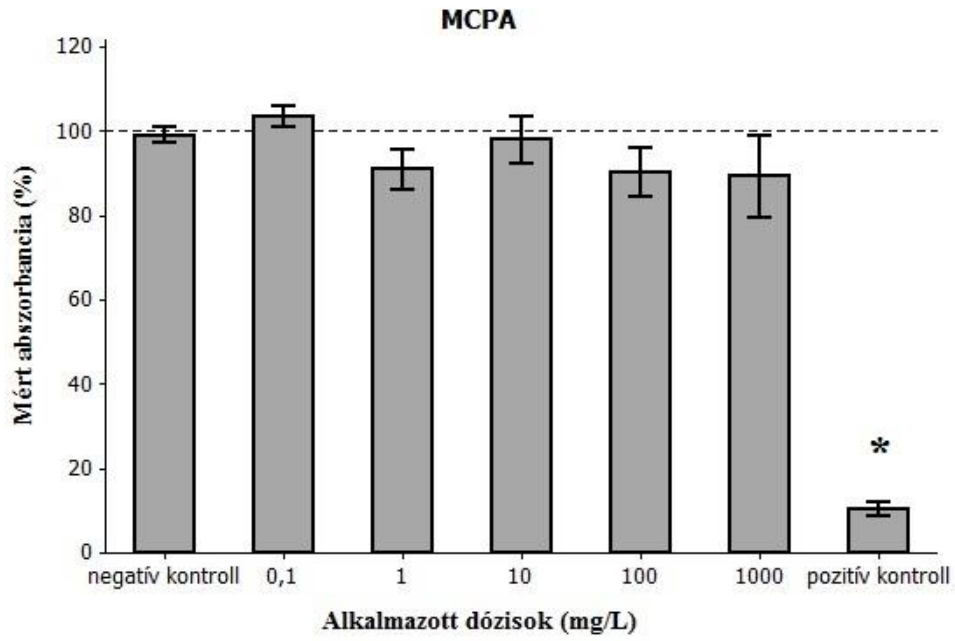
Az MTT citotoxicitási teszt segítségével a 2,4-D, MCPA, mekoprop-P és diklorprop-P hatóanyagok, valamint az utóbbi három ternális keverékének potenciális toxicitását vizsgáltuk EPC halsejteken.

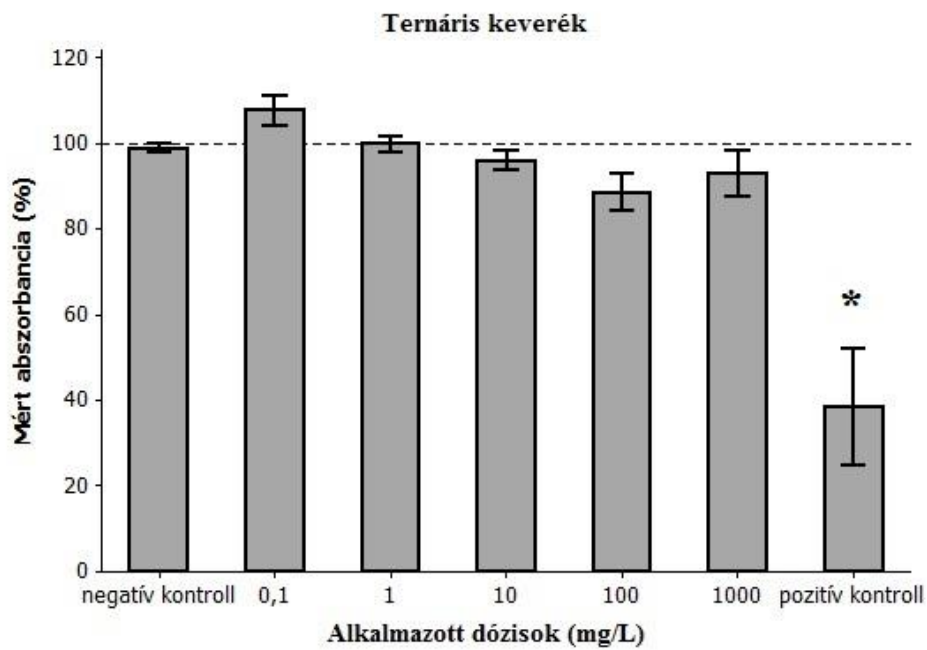
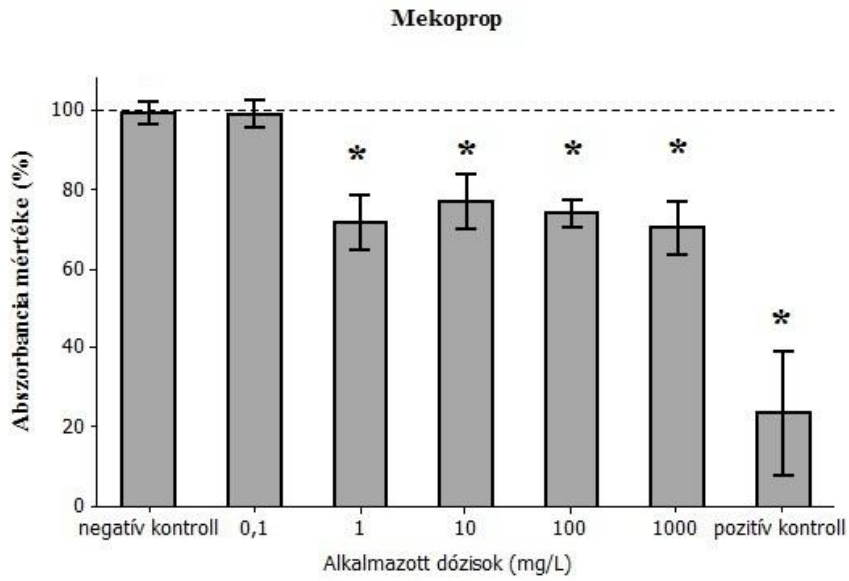
Az általunk végzett vizsgálatok eredményei alapján a 2,4-D, MCPA és a mekoprop-P 0,1-1000 mg/l-es dózisban nem okoztak citotoxikus hatást az MTT tesztben, EPC halsejteken vizsgálva.

A másik három vizsgált hatóanyaggal ellentétben a mekoprop-P esetében 1-1000 mg/l-es dózisban, 24 órás inkubálást követően szignifikáns citotoxicitás volt kimutatható ponty epitheliális sejtekben, ugyanakkor ennél alacsonyabb, 0,1 mg/l-es dózisban már nem volt mérhető toxikus hatás.

Nem találtunk szignifikáns citotoxikus hatást a ternális keverék esetében sem 0,1-1000 mg/l-es dózisban, annak ellenére, hogy az 33%-ban a magában toxikus hatást okozó mekoprop-P-t tartalmazta (18. ábra).







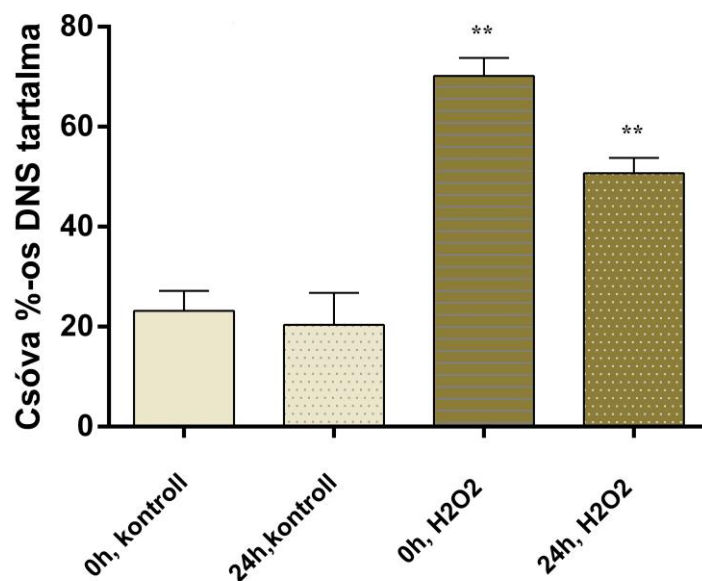
18. ábra: 2,4-D; MCPA; mekoprop-P; diklorprop-P, és az MCPA, diklórprop-P és a mekoprop-P 1:1:1 tömegarányú ternáris keverék vizsgálatának eredménye MTT tesztben, a negatív kontroll átlagának arányában százalékosan (*= $p > 0,05$)

4.3. A comet teszt vizsgálatainak eredményei

4.3.1. A comet teszt optimalizálása EPC halsejteken

4.3.1.1. Az expozíciós idő hatásának vizsgálata

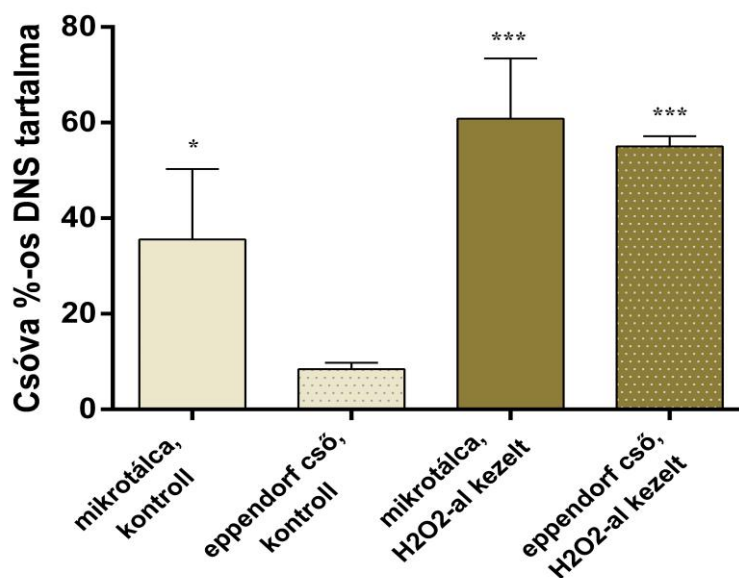
A kísérlet során vizsgáltuk, hogy az expozíciós idő hosszának van-e hatása az EPC halsejtekre. A sejtek egy csoportjában a kezeletlen kontrollt közvetlenül a PBS-ben való mosást követően vizsgáltuk (0h kezelés), másik csoportjukat 24 órán át inkubáltuk 15 °C-on. A vizsgálatokat mindkét esetben elvégeztük H₂O₂, mint ismert mutagén jelenlétében is. A két csoportban kapott eredmények között nem találtunk szignifikáns eltérést, a csóva %-os DNS-tartalma 22,64±2,89 volt inkubálás nélkül és 17,79±5,26 24 órás inkubálást követően (19. ábra). Következésképpen az alkalmazott minimál esszenciális médium kellően gazdag tápanyagokban ahhoz, hogy a sejteket a vizsgálat időtartama alatt, vagyis 24 órán át megfelelő kondícióban tartsa.



19. ábra. Az expozíciós idő hatásának vizsgálata comet tesztben. **= P < 0,01

4.3.1.2. A megfelelő tenyészedény kiválasztása

A teszt elvégzésére az adott okot, hogy az EPC sejtek megtapadási képessége eltérő lehet a különböző felületeken, ez pedig befolyásolhatja állapotukat. A kísérlet során kezeletlen, illetve H₂O₂-al, mint pozitív kontrollal kezelt sejteket alkalmaztunk, amelyeket 24 órán át inkubáltunk 15 °C-on. A sejtek egy csoportját mikrotálcán inkubáltuk, a másik csoportot eppendorf csövekben. Az eppendorf csövekben inkubált EPC sejtek mindhárom vizsgált paramétere (csóvamomentum, hossz, %-os DNS-tartalom) alacsonyabb értéket mutatott, mint a mikrotálcán végzett vizsgálatok esetében kapott értékek (20. ábra). Ennek feltételezett oka, hogy a 24 lyukú mikrotálcán végzett kezelés esetében az inkubációs időszak (24h) során kétszer szükséges tripszinnel kezelni a sejteket. Az erősen sejtkárosító hatású tripszin a kezeletlen kontroll sejteinek részleges károsodását okozta, mely az eredmények nagy szórásához vezetett.

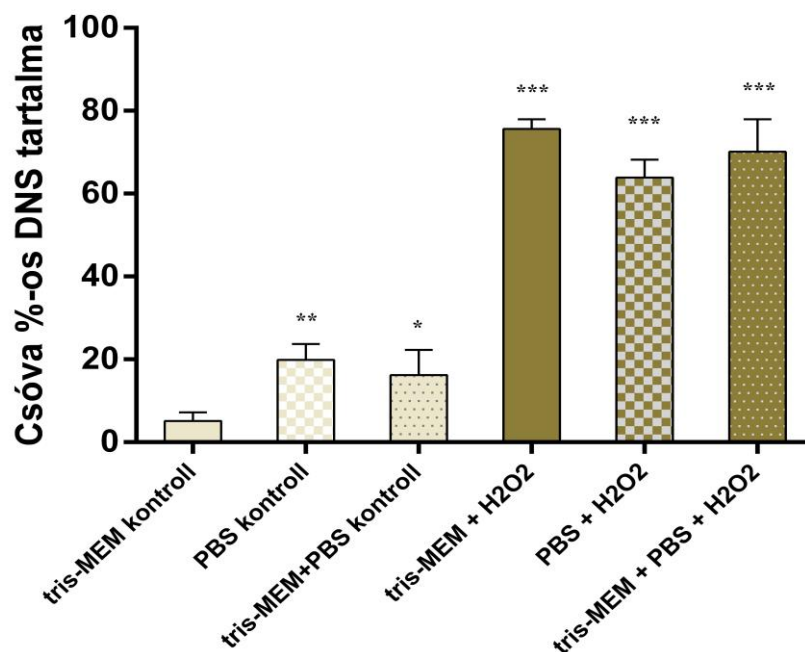


20. ábra. A tenyészedények hatásának vizsgálata comet tesztben. *= P <0,001;

***= P <0,05

4.3.1.3. A megfelelő tápoldat kiválasztása

Ebben a kísérletben a felhasznált tápoldatok hatását vizsgáltuk a sejtek kondíciójára. A sejteket három beállításban, különböző tápoldatokkal (PBS, tris-stabilizált MEM és ezek 1:1 arányú keveréke) inkubáltuk 24 órán át. A legalacsonyabb %-os DNS-tartalmat a csóvában a tris-stabilizált MEM-ben inkubált sejtek esetében mértük ($5,09 \pm 2,09$). A PBS, illetve a PBS és MEM 1:1 arányú keverékének esetében az inkubáció után a csóva %-os DNS-tartalma szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen kontroll esetében is ($19,67 \pm 3,86$, $17,79 \pm 5,26$). A továbbiakban ezért minden esetben tris-stabilizált MEM-et alkalmaztunk az EPC sejtek tápoldataként (21. ábra).

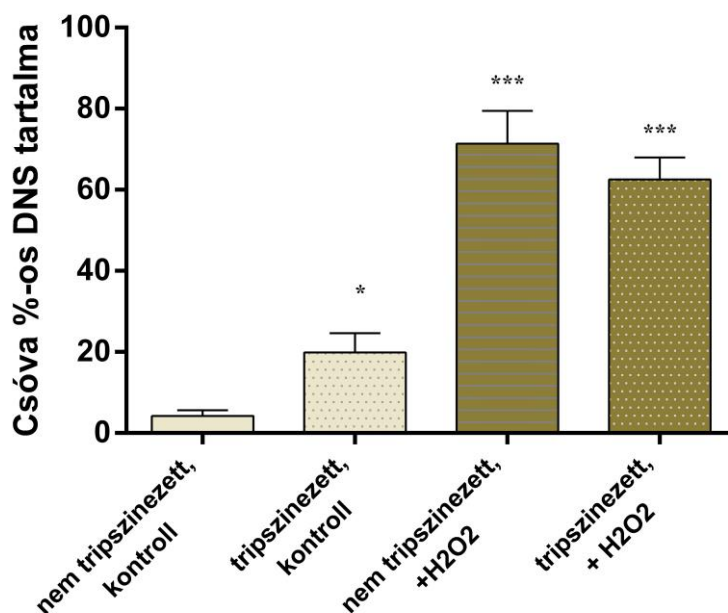


21. ábra. A tápoldatok hatásának vizsgálata comet tesztben. * = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$;

*** = $P < 0,05$

4.3.1.4. A tripszin használatának hatása

A következő kísérlet során az EPC halsejteket két különböző kezelésnek vetettük alá. Az egyik csoportban a sejteket 15 °C-on inkubáltuk, majd enzimátikus disszociációval választottuk szét egymástól őket tripszin felhasználásával. A párhuzamos csoportban -80 °C-on fagyasztott halsejteket használtunk, amelyeket szobahőmérsékleten kíméletesen olvasztottunk ki, majd közvetlenül alávetettük a kezelésnek. Ebben a csoportban elkerülhető volt a tripszin használata, hiszen a sejtek nem tapadtak ki a tenyésztő edény falára, így nem volt szükséges proteáz használata szuszpenzióba vitelükhöz. Mindkét csoport esetében kezeletlen és H₂O₂-al, mint ismert diagnosztikus mutagénnel kezelt beállításokat alkalmaztunk. Szignifikáns különbség volt mérhető a két kezeletlen kontroll között: a csóva %-os DNS tartalma a nem tripszinezett sejtek esetében 4,25±1,36, míg a tripszinnel kezelt sejteknél 19,9±4,72 volt (22. ábra). Ezzel szemben a H₂O₂-al kezelt pozitív controlok között nem találtunk szignifikáns különbséget.



22. ábra. A tripszin hatásának vizsgálata comet tesztben. *= P <0,001; **= P <0,01; ***= P <0,05

4.3.2. Fenoxi herbicidek és hatóanyagaik vizsgálata a comet tesztben

Kísérleteink során a comet teszt alkalmazásával megvizsgáltuk a Dezormon és Optica trió növényvédő szereket, valamint ezek aktív hatóanyagait (2,4-D, MCPA, diklórprop-P, mekoprop-P) is egyénileg és keverékben egyaránt. Az alkalmazott dózisokat a mezőgazdasági gyakorlatban használt dózisok, illetve a környezeti mintákból visszanyert növényvédő szer maradékok mennyisége alapján állapítottuk meg (Frank és Logan, 1988; Munro és mtsai, 1992; Nestorovska-Krsteska és mtsai, 2008; Kurt-Karakus és mtsai, 2010; Lazartigues és mtsai, 2011).

Az elsőként megvizsgált növényvédő szer, a Dezormon szignifikáns hatást mutatott a legnagyobb alkalmazott dózis, 1000 mg/l esetében, ahol a %-os DNS-tartalom a csóvában $45,11 \pm 5,59$ volt. Az alacsonyabb dózisok esetében nem találtam szignifikáns hatást.

A másik vizsgált növényvédő szer, az Optica trió esetében szignifikáns hatást csak igen magas, 10 g/l-es koncentráció esetében tudtunk kimutatni. Itt a csóva %-os DNS-tartalma $37,1 \pm 3,99$ volt.

Szignifikáns dózis-válasz kapcsolat volt kimutatható a 2,4-D esetében: a legnagyobb %-os DNS tartalmat a csóvában a legmagasabb koncentráció 100 mg/l esetében mértük ($55,56 \pm 7,79$), míg 10 mg/l esetében szintén szignifikáns károsodás volt kimutatható mindhárom paraméter, 1 mg/l-es dózisonál az átlagos csóvahossz esetében.

Az MCPA hatóanyag vizsgálata során vizsgált dózisok közül (0,01 mg/l-100 mg/l) egyedül a legmagasabb koncentráció, 100 mg/l alkalmazása során volt kimutatható kis mértékű szignifikáns hatás a %-os DNS-tartalom esetén ($11,68 \pm 4,81$).

Mind a mekoprop, mind a diklórprop vizsgálata során a vizsgált dózisok közül (0,01 mg/l - 100 mg/l) egyetlen koncentrációban sem volt kimutatható szignifikáns hatás a vizsgált paraméterek esetén (csóvamomentum, csóvahossza, csóvaintenzitása).

Végül megvizsgáltuk az Optica trió készítmény három hatóanyagát (MCPA, diklórprop, mekoprop) keverék formájában. 1 l Optica trió 310 g/l diklórprop-P + 160 g/l MCPA + 130 g/l mekoprop-P keverékéből készül, formázószerke hozzáadásával. Az általunk készített keverék ennek megfelelően tömegarányosan tartalmazta a hatóanyagokat. A keverék vizsgálata során kapott eredmények nem mutattak mutagén hatást egyetlen általunk alkalmazott dózis esetében sem (0,1-1000 mg/l).

A csóva %-os DNS tartalmán kívül rögzítettük a csóvamomentumot és a csóva hosszát is. A három paraméter eredményei minden esetben összecsengenek, így megerősítve a vizsgálatok alapján levonható következtetéseket. A kapott eredmények részletesen a melléklet 2., 3. és 4. táblázatában láthatóak.

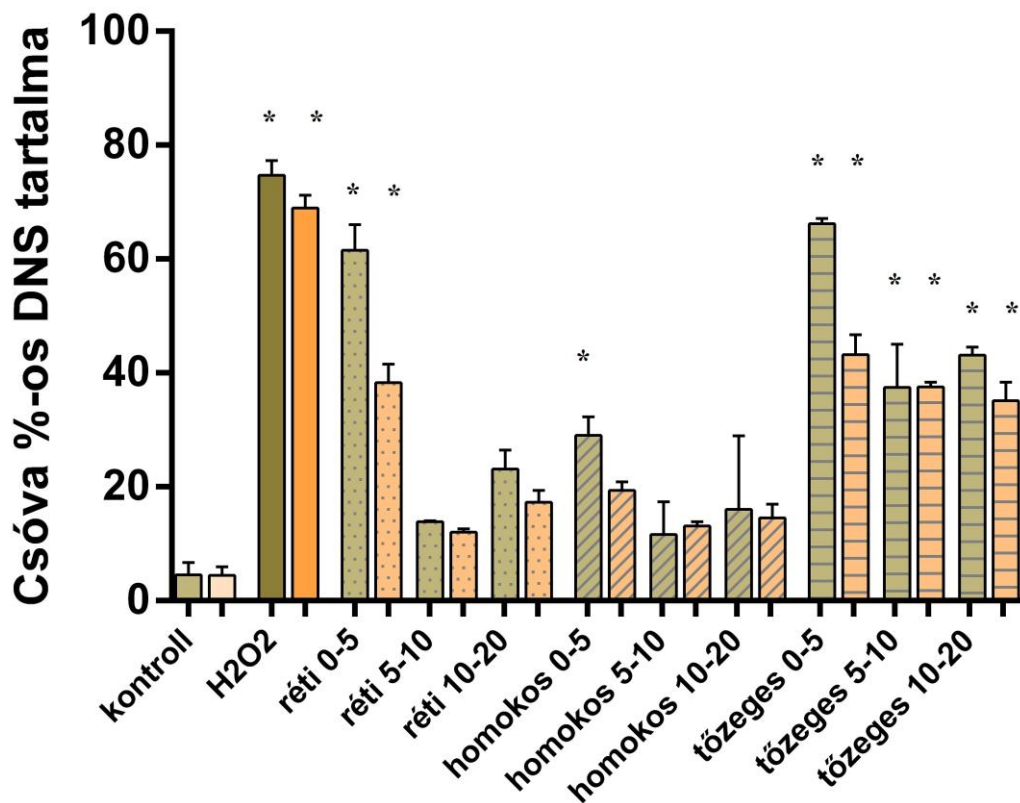
4.3.3. Talajextraktumok vizsgálata a comet tesztben

4.3.3.1. Üvegházi tenyészedényes kísérletből származó talajextraktumok vizsgálata

Az üvegházi vizsgálatok során a talajmintákat 4 l/ha dózisú Optica trió növényvédő szerrel kezeltük. A mintákat a kezelés utáni 3. és 7. napon vettük, 0-5, 5-10, illetve 10-20 cm-es mélységből.

A kezeletlen kontrolltól ($4,50 \pm 2,23$) a talaj felső, 0-5 cm-es szelvényéből, a kezelés utáni 3. napon vett minták szignifikánsan különböztek a réti, homokos, és tőzeges talaj esetében is ($61,53 \pm 4,49$; $29,05 \pm 3,26$; $66,21 \pm 0,89$). Szignifikáns különbséget mértünk a 7. napon is a kezeletlen kontroll ($4,47 \pm 1,48$) és a talajminták felső szelvényei között a réti és a tőzeges talaj esetében ($43,12 \pm 10,08$; $48,01 \pm 3,3$), míg a homokos talajban nem találtunk hatást. Elmondható, hogy a csóva %-os DNS tartalma a 7. napon vett mintáknál minden esetben alacsonyabb volt, mint a 3. napon vett mintáknál, de az azonos földszelvényből származó minták páronkénti összehasonlítása során csak a réti és tőzeges talajok 0-5 cm-es rétegéből származó minták között találtunk szignifikáns különbséget a két mintavételi napon. A tőzeges talajból származó minták a többi talajtípussal szemben mindkét mintavételi napon, mindhárom szelvény esetében szignifikáns különbséget mutattak a kontrollhoz képest (23. ábra).

Hasonló eredményeket kaptunk a másik két paraméter (csóvamomentum, csóva hossza) vizsgálata során is.



23. ábra. Réti, homokos, és tőzeges talajok vizsgálata a kezelést követő 3. és 7. napon comet tesztben. (Zölddel a 3., narancssárgával a 7. napon vett minták eredményeinek kiértékelése.) *= P < 0,05

4.3.3.2. Szabadföldi kísérletből származó talajextraktumok vizsgálata

Az előzetesen végzett tenyészedényes kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a kezelést követő 0-7. napon a kipermetezett Optica trió hatását legnagyobb mértékben a talaj 0-10 cm-es mélységében fejti ki. Ezen eredmények alapján a szabadföldi kísérletekben a mintákat a talaj felső 10 cm-es rétegéből vettük. Az elemzett minták a kezelést követő 3., illetve 7. napi mintavételből származnak.

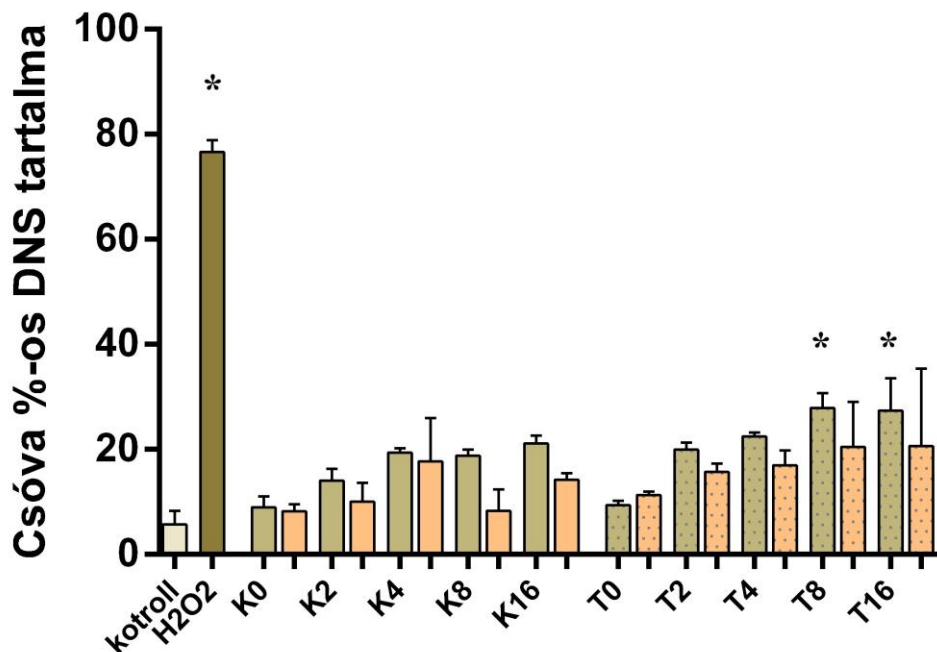
A minták a pozitív kontrolltól igen, a kezeletlen kontrolltól azonban nem különböznek szignifikánsan. Ez alól a 3. napon vett, 8, illetve 16 l/ha Optica trióval kezelt, tarlón hagyott parcellákból származó minták voltak kivételek ($27,85 \pm 2,82$; $27,35 \pm 6,22$), melyek szignifikánsan különböztek a kezeletlen kontrolltól ($5,67 \pm 2,61$).

Bár megfigyelhető a mintákban a csóva %-os DNS tartalmának csökkenése a 7. napon vett mintákban a 3. napi mintákhoz képest, a minták páronként elemzésével nem volt kimutatható szignifikáns különbség.

Szintén nem mutatható ki számottevő különbség az eltérő borítottságú (kukoricával bevetett, illetve tarlón hagyott) parcellák között sem (24. ábra).

A növényvédő szerrel nem kezelt parcellákból (K0, T0) származó talajextraktumok mintái is okoztak némi károsodást az EPC sejtek DNS-ében, bár ez igen kismértékű volt, és minden esetben gyengébb, mint a kezelt parcellák extraktumainak DNS-károsító hatása.

A másik két paraméter (csóvamomentum, csóva hossza) vizsgálatának eredményei megegyeznek a csóva %-os DNS tartalmának vizsgálatokor kapott eredményekkel.



24. ábra. Kukoricával borított és tarlón hagyott talajok vizsgálata a kezelést követő 3. és 7. napon comet tesztben. 0: kezeletlen; 2: 2 l/ha; 4: 4 l/ha; 8: 8 l/ha; 16: 16 l/ha Optica trióval kezelt parcella. (Zölddel a 3., narancssárgával a 7. napon vett minták eredményeinek kiértékelése.) *= P < 0,05

5. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A fenoxi-karbonsav típusú növényvédő szerek és hatóanyagaik toxikus hatásával kapcsolatos vizsgálatok

Az *Allium cepa* teszt segítségével elvégeztük az Optica trió, Dezormon, valamint hatóanyagaik toxikus hatásainak vizsgálatát. A hatóanyagokat bináris és ternáris keverékekben is megvizsgáltuk, a kapott effektív koncentrációk eredményét összehasonlítottuk az általunk számított eredményekkel. A bináris párok esetében a MCPA-mekoprop-P és az MCPA-diklórprop-P pároknál a számított koncentrációnál magasabb (1,51-szer illetve 1,37-szer) effektív koncentrációs adatokat mértünk, míg a diklórprop-P-mekoprop-P párosnál a számítottnál 1,5-szer alacsonyabb értéke lett a mért koncentrációnak. Feltételezhető, hogy jelen esetben a szinergisztikus hatások léptek fel, ha a párost fenoxi-propionsavak alkották, ugyanakkor, ha az egyik fenoxi-propionsavat fenoxi-ecetsav típusú hatóanyagra cseréltük, a szinergisztikus hatások nem voltak megfigyelhetőek.

A ternáris keverék esetében azonban szintén felléptek a szinergisztikus hatások, melyek következtében a keverék mért EC_{50} koncentrációja 2,5-szer kisebb volt, mint a számított érték. A vizsgálat jól példázza, hogy milyen együttes hatások léphetnek fel a kemikáliák keverékeiben, melyek az egyéni hatásoknál sokkal erősebbek is lehetnek akár.

A 2,4-D, az MCPA, a Dezormon és az Optica trió magasabb koncentrációinak esetében megfigyelhető volt a gyökérnövekedés gátlásán kívül a hagymatönc megnyúlása is. Ezt a jelenséget a tönköt áttörni nem képes, így abban néhány mm-re fejlődő gyökerek okozták, valamint a főrügy körül fejlődő húsos levelek rendellenes, a gyökér felé irányuló növekedése (Ateeq és mtsai, 2002). A sejtek rendellenes, ún. C-mikózisos osztódására utaló tumoros elváltozást is megfigyeltünk, mely az osztódás során a magorsó kialakulásának hiányát jelzi (Rieder és Palazzo, 1992).

Az MCPA és a 2,4-D kis mértékben volt toxikus édesvízi halakra az élő állatokkal végzett tesztek során, a mért LC_{50} érték 232 mg/l MCPA volt szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében, és 3758 mg/l 2,4-D guppi (*Lebistes reticulatis*) vizsgálatokor (Tscheu-Schluter 1974). Az EPC halsejteken alkalmazott MTT tesztet alkalmazva, az általunk végzett vizsgálatok eredményei szerint azonban

eme vegyületek még 1000 mg/l-es dózisban sem okoztak citotoxikus hatást ponty epitheliális sejteken vizsgálva őket.

A felszíni vízmintákban a mekoprop szennyezettség 1-800 ng/l, a diklórprop 1-110 ng/l között volt mérhető az elmúlt években (Nestorovska-Krsteska és mtsai, 2008, Kurt-Karakus és mtsai, 2010), vizsgálatainkban azonban a diklórprop nem mutatott citotoxikus hatást 0,1-1000 mg/l-es dózisban. Az élő halakon elvégzett vizsgálatok szerint a diklórprop LC₅₀ értéke 48 órás tesztben, ponty esetében 960 mg/l, guppik vizsgálata során 2300 mg/l volt (Ohe és mtsai, 2004).

A mekoprop gyenge akkumulációra hajlamos halakban, az LC₅₀ értéke szivárványos pisztrángra vonatkozóan 96 órás tesztben 124 mg/l volt, míg a kékkopoltyús naphal (*Lepomis macrochirus*) esetében 10-100 mg/l 24-96 órás tesztekben (Meister, 1994). Ez az eredmény összhangba hozható a vizsgálataink során tapasztalt hatásokkal, ahol 1-1000 mg/l-es dózisban, 24 órás inkubálást követően szignifikáns citotoxicitás volt kimutatható ponty epitheliális sejtekben, ugyanakkor ennél alacsonyabb, 0,1 mg/l-es dózisban már nem volt mérhető toxikus hatás.

Nem találtunk hatást a ternáris keverék esetében sem, annak ellenére, hogy az 33%-ban a magában toxikus hatást okozó mekoprop-P-t tartalmazta. Feltehetőleg szupresszív, antagonist hatások léptek fel, melynek következtében a mekoprop toxikus hatása nem érvényesült.

5.2. A fenoxi-karbonsav típusú növényvédő szerek és hatóanyagaik genotoxikus hatásával kapcsolatos vizsgálatok

Az *Allium cepa* teszt esetében a fenoxi-karbonsav hatóanyagok vizsgálata során az egyéni hatóanyagok esetében nem találtunk szignifikáns hatást. A 2,4-D hatóanyagot már vizsgálták korábban is (Ateeq és mtsai, 2002), ebben a vizsgálatban szignifikáns mutagén hatás volt kimutatható. Azonban a kísérlet során a szerzők nem az EC₅₀ értéknél alacsonyabb dózisokat alkalmaztak. Az EC₅₀ érték megállapítására tett kísérleteik során többszöri, ismételt vizsgálatban sem sikerült kellően alacsony dózist alkalmazniuk, így a genotoxicitást vizsgáló tesztben EC₅₀ érték feletti dózisokat alkalmaztak, amelynek következtében a gyökérszőrök növekedése is minimális, néhány mm-es volt csupán. A mutagenitási tesztben ezeket az egyértelműen citotoxikus hatás alatt álló gyökérszőr sejteket vizsgálták. E tények ismeretében nem meglepő, ha az

általunk végzett vizsgálatok során nem sikerült olyan erőteljes kromoszóma aberrációs hatásokat kimutatnunk, mint a fent említett szerzőknek.

Az egyedi hatóanyagokkal szemben azonban a ternáris keverék esetében szignifikánsan kimutatható mutagén hatást detektáltunk EC₄₅ dózisban. Ebben az esetben szinergisztikus hatások fellépése okozhatta a fellépő kromoszóma aberrációkat.

A mitotikus index értékének alakulásában gyenge dózis-hatás volt megfigyelhető: a hatóanyagok növekvő koncentrációjával kis mértékben csökkent a mitotikusan osztódó sejtek száma a legtöbb vizsgált hatóanyag, illetve keverékük esetében is. A mitotikus indexet 1000 sejt esetén a mitózis bármely fázisában lévő sejtek számából határoztuk meg, ez az index tehát a vizsgált gyökér növekedési zónájának, a gyökércsúcs sejtjeinek osztódásra való hajlamát vizsgálja (Fiskesjö, 1985). Amennyiben a mitotikus index csökken, ez feltehetőleg a sejt proliferációs folyamataira ható citotoxikus effekteknak köszönhető.

Az *Allium cepa* teszttel ellentétben a comet teszttel vizsgálva a fenoxi-karbonsav-herbicideket, néhány esetben sikerült genotoxikus hatást kimutatnunk.

A Dezormon hatóanyag-tartalma 600 mg/l 2,4-D dimetilamin-só formájában (Ocskó és mtsai, 2009). A legalacsonyabb, már pozitív hatást mutató dózis (1000 mg/l) esetében 0,5 mg/l 2,4-D hatóanyag tartalommal számolhatunk. Vizsgálataink során a 2,4-D esetében szignifikáns hatást mértünk mindhárom vizsgált paraméter esetében 10 mg/l-es dózisonál, illetve a csóvahossz esetében már 1 mg/l esetében kimutatható volt a szignifikáns különbség a kezeletlen kontroll és az alkalmazott dózis között. Ezek az eredmények összhangba hozhatóak, illetve feltételezhető, hogy a Dezormon növényvédő szer készítmény esetében a mutagén hatásért a 2,4-D hatóanyag a felelős, a formázószer nem okoznak szinergisztikus hatásokat.

Hasonlóképpen, míg az Otica trió csak igen nagy koncentrációban (10000 mg/l) mutatott enyhe genotoxikus hatást, addig az egyik hatóanyaga, az MCPA gyengén genotoxikus volt 100 mg/l-es koncentrációban. Mindkét esetben az lehet a magyarázat a növényvédő szereknek a hatóanyagaiknál sokkal kisebb genotoxikus hatására, hogy azokban dimetilamin só formájában vannak jelen az aktív komponensek az oldatban. Feltételezhető tehát, hogy a fenoxi-alkán-karbonsavak dimetilamin sói kevésbé genotoxikus hatásúak.

A 2,4-D esetében a magyarországi nyersvizekből kimutatható maximális koncentráció 1998-ban 270 ng/l volt (Károly és mtsai, 2001), a felszíni vizeken 1994-

2000 között elvégzett nemzetközi vizsgálatok maximálisan 1-10 ng/l-es szennyezettséget mutattak a 2,4-D-re vonatkozóan (Frank és Logan, 1988; Lazartigues és mtsai, 2011). Ez nagyságrendekkel alacsonyabb, mint az EPC comet tesztben vizsgált, esetleges mutagén hatást okozó dózisok: vizsgálatainkban 10, illetve 100 mg/l-es dózisok esetében találtunk mutagén hatást. A 2,4-D féléletideje a talaj mikrobiális aktivitásának köszönhetően kevesebb, mint 7 nap (Clements és mtsai, 1997; Fu és mtsai, 2009). Bár ez a hatóanyag relatíve bomlékonyak mondható, a 2,4-D tartalmú növényvédő szerek intenzív használata így is a nem-célszervezetek kontaminációjához vezethet (Merini és mtsai, 2007). Miként vizsgálataink eredményei is mutatják, ez a hatóanyag képes DNS károsodást okozni EPC sejteken, 24 órás inkubációt követően.

A talajmintákban, valamint a felszíni vízmintákban az MCPA szennyezettsége 100 ng/l-30 µg/l között volt mérhető az elmúlt években (Comoretto és mtsai, 2008; Kurt-Karakus és mtsai, 2010). Ez szintén nagyságrendekkel alacsonyabb, mint az esetlegesen mutagén hatásokat okozó legalacsonyabb, 100 mg/l-es dózis.

A felszíni vízmintákban a mekoprop és diklórprop szennyezettsége 100 ng/l-10 mg/l között volt mérhető az elmúlt években (Nestorovska-Krsteska és mtsai, 2008; Kurt-Karakus és mtsai, 2010), az általunk végzett vizsgálatok eredményei szerint azonban eme vegyületek még 100 mg/l-es dózisban sem okoztak mutagén hatást.

Egy lehetséges magyarázat a fenoxi-karbonsav herbicidek eltérő mértékű mutagén hatására a vizsgált vegyületek kismértékben eltérő szerkezete, és ezen keresztül eltérő affinitásuk a célsejtek receptoraihoz. Az auxin típusú herbicidek receptorokhoz kötődő aktív csoportja a karboxil csoport, illetve a metilén csoport szénatomja a karboxil csoport és az elektrofil gyűrű között. A különböző ligandumok befolyásolják a gyűrű elektronfelhőjének állapotát, illetve az egész molekula konformációját. Ennek megfelelően eltérő a különböző vegyületek kapcsolódása a receptorokhoz, ezen keresztül pedig a felvételük, transzportjuk és metabolizációjuk is eltérő (Venkov és mtsai, 2000; Cobb és Reade, 2010).

A comet tesztrel végzett kísérleteink során szignifikáns mutagén hatást tudtunk kimutatni a fenoxi-ecetsavak esetében, míg a fenoxi-propionsavaknál nem találtunk mutagén hatást. Feltételezhetjük tehát, hogy a hatásokért ez esetben a karbonsav ligandum a felelős, amely két szénatommal hatásosan kötődhet a sejtmembrán receptorához, ugyanakkor a 3. metilgyök bevezetésével elveszti az affinitását, így a kötődés hiányában hatást sem vált ki.

Természetesen az elvégzett kísérletek során további dózisok, magasabb koncentrációk vizsgálata esetleg további érdekes eredményekhez vezethetett volna. A kísérletek eltervezése során a vizsgált koncentrációkat igyekeztünk realisztikusan megválasztani, főként a mezőgazdasági gyakorlatban alkalmazott dózisok, illetve a környezeti mintákból visszamérhető szermaradékok koncentrációi alapján. Azonban két vizsgált peszticid (Optica trió, Dezormon) esetében a vizsgálatok célja a LOEC (legalacsonyabb mért hatásos koncentráció) értékek megállapítása is volt, ezért esetükben magasabb koncentrációk beállítása is szükségessé vált. Mivel ezek a növényvédő szerek a kereskedelmi forgalomban kaphatók, így sokak, nem csak szakemberek számára is elérhetőek, így e két kemikália esetében a hatásos koncentrációk meghatározása is fontos és szükségszerű.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy amennyiben a mezőgazdasági gyakorlat során a vizsgált növényvédő szerekből az ajánlásnak megfelelő mennyiség kerül kipermetezésre, a talajba kerülő hatóanyagok mennyisége nagyságrendekkel elmarad a káros küszöbértéktől.

E kísérleteket azonban minden esetben relatív rövid, az *Allium cepa* tesztekben 48, a comet tesztben 24 órás expozíciós idővel végeztük. A vizsgált hatóanyagok féléletideje a természetben átlagosan 20-35 nap közé tehető (Fu és mtsai, 2009; Kurt-Karakus és mtsai, 2010). A bomlási folyamatokat elősegíti a talaj mikrobiális tevékenysége, melynek aktivitását befolyásolja a hőmérséklet, a pH és a nedvességtartalom (Filep és mtsai, 1999). Így további, realisztikusabb tanulmányok lennének szükségesek, amelyeket hosszabb inkubálási idővel és alacsonyabb dózissal végzünk, hogy még pontosabban megbecsülhessük a vegyületek reális veszélyeit.

5.3. A fenoxi-alkán-karbonsav típusú növényvédő szerrel kezelt talajkivonatok mutagenitásával kapcsolatos vizsgálok

Tenyészedényekben végzett kísérletünkben különféle típusú talajokat (tőzeges virágföld, humuszos homoktalaj, szolonyeces réti talaj) kezeltünk Optica trió növényvédő szerrel, majd a kezelt mintákból extraktumot készítettünk, esetleges mutagén hatásait vizsgáltuk a comet és *Allium cepa* tesztek segítségével.

Az *Allium cepa* teszt esetében nem találtunk szignifikáns hatást. Az *Allium cepa* teszt már sok esetben bizonyította, hogy kiválóan alkalmas környezeti minták monitorozására, ám eddig jellemzően felszíni- és szennyvizek vizsgálatára alkalmazták (Rank és Nielsen, 1998; Leme és Marin-Morales, 2009b; Radić és mtsai, 2010). Tapasztalataink azt mutatják, hogy szennyezett talajok esetén a talajextraktumok mellett érdemes lenne a csurgaléklét is vizsgálni az *Allium* tesztben, amely természeténél fogva folyadékok vizsgálatára a legmegfelelőbb.

A comet tesztben a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hatást sikerült kimutatnunk a felső, 0-5 cm-es talajszelelvény esetében, míg a többi vizsgált szelelvény (5-10; 10-20 cm) esetében a hatás szintén mérhető volt, de gyengébb. Bár a fenoxi-karbonsav herbicidek mobilisek a talajban, és akár a C talajszelelvényig is eljuthatnak (Kidd és James, 1991), vizsgálatunk azt mutatják, hogy hatásuknak mégis elsősorban a legfelső néhány cm-es zóna van kitéve. Kimutattuk továbbá a talajmintákban a mutációs hatás csökkenését a 7. napon a 3. napi eredményekhez mérten. Az auxin típusú herbicidek féléletideje a talajban átlagosan 20-35 nap közé tehető (Fu és mtsai, 2009; Kurt-Karakus és mtsai, 2010), így 7 nap után már kimutatható a hatóanyagok csökkenése. Míg a homokos talajextraktumok vizsgálata során a DNS kisebb mértékű károsodását állapítottuk meg, a tőzegetes virágföldben nagyobb arányú károsodást detektálhattunk. A szignifikáns különbséget az eltérő talajszerkezet okozhatta. A fenoxi-karbonsavak a homokos szerkezetű talajból igen gyorsan kimosódnak (Petrovic és mtsai, 1993). A magas szervesanyag tartalmú, savas kémhatású talajokban ugyanakkor gyenge savként viselkedő fenoxi-karbonsav herbicidek adszorbeálódhatnak a talajkolloidokhoz, mely meggátolhatja vagy lelassíthatja a kimosódási folyamatot (Filep és mtsai, 1999).

A vizsgálatok a comet teszt esetében szabadföldi kísérletből származó talajextraktumok tesztjeivel egészültek ki.

Bár a szabadföldi kísérletek egyes parcelláit magasabb dózissal kezeltük, mint a földeket a tenyészedényes kísérlet esetén, ennek ellenére gyengébb hatást tapasztaltunk. Szignifikánsan mutagén hatást csak a 8, illetve 16 l/ha dózisban kezelt, parlagon hagyott parcellák esetében mértünk a kezelés utáni 3. napon vett mintáknál, majd a 7. napi mintáknál már a hatás a szignifikancia szint alá esökkent. A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy szabadföldön nem csak a talaj mikrobiális tevékenysége érvényesül jobban, de a közvetlen napsütésnek kitéve fotokémiai reakciók

következtében is hamarabb bomlanak le a hatóanyagok, mint izolált körülmények között (Meylan és Howard, 1993; Filep és mtsai, 1999).

A vizsgálatok során külön kezeltük a parlagon hagyott, majd egy-és kétszikű gyomokkal benőtt és a kukoricával bevetett parcellákat. A két eltérő borítottságú parcella típus között a 8, illetve 16 l/ha dózissal kezelt parcelláknál volt megfigyelhető a különbség, itt a gyomokkal borított területen mutagén hatás volt kimutatható a talajminták extraktumaiból. Az eltérő hatás oka az eltérő borítottsági százalék lehetett: a kukoricánövények nagyobb mértékben fedték a talajt, így a permetezés során itt esetleg kevesebb permetszer kerülhetett a talajba.

Figyelemre méltó azonban, hogy a növényvédő szerrel nem kezelt parcellákból (K0, T0) származó talajextraktumok mintái is okoztak némi károsodást a DNS-ben, bár ez igen kismértékű volt, és minden esetben gyengébb, mint a kezelt parcellák extraktumainak DNS károsító hatása. Ez arra enged következtetni, hogy a talajban, mint komplex mátrixban jelen levő egyéb anyagok (esetlegesen felhalmozódott, kumulálódott peszticidek, nehézfémek) igen gyenge mutációs hatást okozhatnak.

Végezetül megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott mutagenitási tesztek alkalmasak környezeti minták, esetünkben talajmintákból származó extraktumok monitorozására.

5.4. Az EPC comet teszt optimalizálásával kapcsolatos vizsgálatok

Megvizsgáltuk az EPC halsejtvonalon végzett comet teszt számos paraméterét azzal a céllal, hogy a teszt alkalmazásával még pontosabb, megbízhatóbb eredményekhez juthassunk.

Az expozíciós idő vizsgálata során megállapítottuk, hogy a sejteket a kezelés után inkubáció nélkül azonnal fixálva, illetve 24 órás expozíciós időt alkalmazva ennek a tényezőnek nincs hatása a teszt eredményére, így elmondható, hogy a tesztek ezen időintervallumon belül biztonságosan végezhetőek bármilyen expozíciós időtartammal.

Megvizsgáltuk a teszt során alkalmazott tápoldatokat is, és felállítottuk a következő sorrendet:

100% PBS < 50% PBS + 50 % tris-MEM < 100% tris-MEM,

azaz a tiszta tris-MEM használata ajánlott leginkább az EPC sejtek tápoldataként.

Az EPC sejtek inkubálása során használt tenyészedények vizsgálatával megállapítottuk, hogy az eppendorf cső szignifikánsan alkalmasabb a halsejtek tárolására. A kísérlet során TC (Tissue Culture) felületkezelt mikrotálcákat alkalmaztunk, melyek felülete a hagyományos felületű tenyészedényektől eltérően ionos oxigén csoportokat tartalmaz. Az ionos felület hidrofil, negatív töltésű felületet hoz létre a tenyészmédiummal érintkezve, ezáltal elősegíti a sejtek szétterjedését és letapadását. Huszonnégy lyukú mikrotiter tálca alkalmazása esetén a sejtek a 24 órás inkubációs idő alatt letapadnak a tálca falára, ahonnan tripszines emésztéssel kell azokat leválasztani az inkubációs időszak végén (Tong, 1974; Adamicza és mtsai, 2007). Ezzel szemben az eppendorf cső alkalmazása esetén a sejtek nem tapadnak le 24 óra alatt az eltérő felületnek köszönhetően, így a tripszin használata elkerülhető.

Vizsgálataink kimutatták, hogy az EPC comet teszt során a tripszin használata, illetve ennek lehetséges elkerülése kritikus. Mivel a tripszin képes csökkenteni a metabolizmussal és növekedéssel kapcsolatos fehérjék expresszióját, egyidejűleg pedig fokozza az apoptózis regulátor proteinek expresszióját, így képes nagymértékben károsítani a membrán fehérjéket, és így a teszt során a sejtek károsodásához és a csóva megnövekedett DNS-tartalmához vezet (Huang és mtsai, 2010). A tripszin elkerülése a vizsgálatok során javasolt, így elkerülhetőek az általa okozott károsodások, melyek a sejt működésének szabályozásában okozhatnak zavarokat (Peralta Soler és mtsai, 1997). Ugyanakkor a tripszin használata igen elterjedt a sejtenyésztéseket alkalmazó tesztek során, mivel a sejtek fellazulását, majd a tenyésztőfelszínről történő leválását okozza (Stingl és mtsai, 2005). Az enzimatikus emésztés nagyon hatékony módszer, de ha nem a megfelelő ideig történik, károsíthatja, lebonthatja a sejt felszíni fehérjéket, illetve érzékeny tesztek esetén mérhető károsodást okoz a sejt DNS-ében.

A kevés extracelluláris mátrixot tartalmazó sejt kultúrákban a letapadó sejtek szuszpenzióba vihetőek mechanikai módon, a tenyészedény rázogatójával, ütögetésével, vagy ún. mechanikus disszociálással, ebben az esetben elkerülhető a tripszin használata. Sokszoros sejt kapcsolatokkal rendelkező sejtenyésztés esetében azonban a mechanikus megoldás nem elég hatékony, ilyen esetekben általában enzimatikus emésztést szoktak alkalmazni. Ismertek azonban más módszerek, egyéb törekvések a tripszin elkerülésére.

Shiba és munkatársai (1998) olyan folyadék-folyadék felületű sejtenyésztési módszert dolgoztak ki, ahol a sejteket a tenyészmédium és egy hidrofób folyadék

találkozásának felületén tenyésztették. Ebben az esetben a sejtek passzálása megoldható egyszerűen, pipetta segítségével, nem szükséges a tripszin használata. A kísérlet során egér fibroblaszt sejtek növekedését és morfológiáját vizsgálták folyadék-folyadék felületű rendszerben, mely minimális esszenciális médiumból, illetve viszkózus fluorokarbonból állt. A sejtek növekedésével kapcsolatban megállapították, hogy az lassabb, mint a hagyományos polisztirol felületen. A sejttelep morfológiáját vizsgálva azt találták, hogy azok egyetlen réteg (monolayer) helyett inkább szférikus, gömbszerű alakzatokat hoznak létre a két folyadékfázis felületén. Mindezen eredmények azt támasztják alá, hogy a folyadék-folyadék környezetben inkubált sejtek számára az adhézió nehezebben elérhető.

Herzog és munkatársai (2011) kolorektális tumor sejteken végeztek vizsgálatokat, melyekből a dendritikus sejterápia során felhasználható szuszpenziót készítettek. A sejteket a kísérlet során tripszin felhasználásával vitték szuszpenzióba, míg egy párhuzamos vizsgálatban tripszin helyett EDTA-t használtak. Az EDTA képes a kalcium-függő sejtkapcsolódások felszámolására, melyek alapvetőek az adhéziós sejtkultúra kialakításában. Megállapították, hogy az EDTA alkalmas a vizsgált sejtek esetében a tripszin helyettesítésére, anélkül, hogy károsítaná a tumor sejtek felületén expresszálandó antigéneket, míg a tripszines emésztés során fontos felületi proteinek károsodtak.

2013-ban született a tanulmány, melyet Wei és munkatársai publikáltak. A kutatócsoport olyan 3 dimenziós sejtkultúra kifejlesztésén dolgozott, melyben a tripszin alkalmazása nem szükséges. Kifejlesztettek egy hidrobutil-kitozán alapú hidrogélt, melynek speciális tulajdonsága, hogy 37 °C-on zselés, 20 °C-on folyadék állagú. Így a 37 °C-on, gélben inkubált sejtek 20 °C-ra lehűtve folyékony halmazállapotú szuszpenzióba kerülnek, passzálásukhoz nem szükséges a proteolitikus tripszin használata. Ugyanakkor a kifejlesztett hidrogél igen enyhe citotoxikus hatást mutat egér fibroblaszt sejteken, valamint humán mezenchimális őssejteken, így felhasználhatósága nem teljes körű.

A tripszin használatának elkerülésére alkalmas az általunk kifejlesztett módszer, mely során nem a hagyományos módon, 15 °C-on inkubált sejtenyészetet használunk, hanem fagyasztott sejteket. Míg a folyékony tápoldatban a sejtek kitapadnak a tenyésztedény falára, és enzimátikus emésztés szükséges leválasztásukra, addig a -80°C-

on tárolt sejtek esetében a tripszin használata elkerülhető, a sejteket a kíméletes felolvasztás után rögtön lehet kezelni a vizsgálandó anyaggal.

Vizsgálataink során megállapíthattuk, hogy az EPC halsejtvonalon, tripszin használata nélkül végzett comet teszt kiválóan alkalmas nemcsak növényvédő szerek, de környezeti minták vizsgálatára is. Használata ökotoxikológiai tesztek során nem csupán egyszerűsége, gyorsasága és viszonylagos alacsony költsége miatt javasolt, de emellett fontos tényező az is, hogy megfelel a modern állatvédelmi szempontoknak és EU direktíváknak is (REACH).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során célul tűztük ki a fenoxi-alkán-karbonsav herbicid növényvédő szerek (Optica trió és Dezormon), valamint hatóanyagaik (2,4-D, MCPA, mekoprop, diklórprop) revízióját, citotoxikus és mutagén hatásaik vizsgálatát. A hatóanyagok egyedi hatásán túl elvégeztük együttes hatásuk kockázatbecslését is, valamint megvizsgáltuk a vegyületek együttes alkalmazása során okozott citotoxikus és mutagén hatásokat. Vizsgálatainkhoz olyan toxicitási és mutagenitási tesztekkel választottunk, melyek alkalmazása megfelel a nemzetközi gyakorlatnak, alkalmazásuk gyors, egyszerű, és relatív olcsó, így Magyarországon is elterjedhetnek. A tesztekhez eltérő testszervezeteket választottunk, így a kapott eredmények extrapolálhatósága vizsgálhatóvá vált az eltérő célszervezetek között.

Az auxin hatású növényvédő szerek és aktív hatóanyagaik vizsgálatán túl ezek mutagén hatásának felmérését is elvégeztük a talajba, mint komplex mátrixba kerülve. Az auxin hatású herbicidek vizsgálati mellett az EPC comet tesztet is optimalizáltuk, vizsgáltuk a teszt során alkalmazott paramétereket, hogy a legmegfelelőbb tesztkörülményeket választhassuk meg.

Az *Allium cepa* tesztben az egyedi hatóanyagok EC_{50} értékei mellett mértük azok bináris és ternáris keverékeinek hatását is. A diklórprop-P–mekoprop-P páros esetében feltételezhetően szinergisztikus hatások léptek fel, amelyek következtében a mért hatásos koncentráció értéke alacsonyabb a számítottnál. Hasonlóképp, a ternáris keverék esetében is megfigyelhetőek voltak szinergisztikus hatások, melyek következtében a keverék mért EC_{50} koncentrációja 2,5-szer kisebb volt, mint a számított érték.

A fenoxi-karbonsav hatóanyagok nagy dózisban alkalmazva deformált gyökérszőrök megjelenését, a hagymatönk rendellenes megnyúlását, valamint C-mitózisra utaló tumoros sejtek megjelenését okozták a hagymákon.

Az *Allium cepa* tesztben vizsgált növényvédő szerek és hatóanyagaik közül egyedül a ternáris keverék vizsgálatokor sikerült szignifikáns mértékű kromoszóma aberrációt kimutatnunk. A mitotikus index értékének alakulásában azonban szinte minden esetben gyenge dózis-hatás volt megfigyelhető, vagyis a hatóanyagok növekvő

koncentrációjával szemben kis mértékben csökkent a mitotikusan osztódó sejtek száma a sejt proliferációs folyamataira ható citotoxikus effekteknek köszönhetően.

Az Optica trióval kezelt talajminták esetében nem találtunk szignifikáns genotoxikus hatást az *Allium cepa* tesztben.

Az MTT teszt alkalmazásával kimutattuk, hogy 0,1-1000 mg/l nagyságrendben a 2,4-D, MCPA és a diklórprop nem okoz citotoxikus hatást ponty epithelialis halsejteken, ugyanakkor mekoprop esetében 1-1000 mg/l-es dózisban szignifikáns hatás volt mérhető.

Nem volt szignifikáns hatás a ternáris keverék esetében sem, annak ellenére, hogy az 33%-ban a magában citotoxikus hatást okozó mekoprop-P-t tartalmazta. Feltehetőleg szupresszív, antagonistá folyamatok léptek fel, melynek következtében a mekoprop toxikus hatása nem érvényesült.

Az EPC comet teszt optimalizációja során vizsgáltuk a felhasznált tenyészmédiumot, a tenyészedeny típusát, az inkubációs idő hosszát, valamint a tripszin hatását a sejtek kezelésekor. A tenyészedenyek közül az eppendorf csövet alkalmasabbnak találtuk a 24 lyukú mikrotálcánál a kísérletek elvégzésére, míg a tenyészmédiumok esetében a következő sorrendet állapítottuk meg: 100% PBS <50% PBS + 50 % tris-MEM <100% tris-MEM, vagyis a 100%-os tris-MEM alkalmazása a leginkább ajánlott. A 24 órás inkubációs idő nem volt hatással az EPC sejtekre, ezzel szemben a tripszin alkalmazása a sejtek kezelése során szignifikáns genotoxikus hatást okozott, ezért ajánlott a comet teszt elvégzéséhez fagyasztott sejteket használni az általunk kifejlesztett módszer szerint, mivel így elkerülhető a tripszin alkalmazása.

A comet tesztben megvizsgált növényvédő szerek gyenge genotoxikus hatást mutattak magas koncentráción: az Optica trió 10000 mg/l-es dózison, míg a Dezormon 1000 mg/l-es koncentrációban növelte a csóva %-os DNS tartalmát. A 2,4-D-t erősen genotoxikusnak találtuk már 10 mg/l-es koncentrációban is, míg az MCPA hatása 100 mg/l-es koncentráción volt kimutatható. A fenoxi-ecetsavakkal szemben a fenoxi-propionsavak nem okoztak genotoxikus hatásokat az általunk vizsgált koncentrációkban, melynek feltehetően a molekulák eltérő konformációja, és így a receptorokhoz való különböző affinitásuk volt az oka.

A tenyészedenyes kísérletből származó, Optica trióval permetezett talajminták esetében szignifikánsan növekedett a csóva %-os DNS-tartalma a talajok felső, 0-5 cm-es rétegéből származó minták vizsgálatakor. A vizsgált talajok közül a legerősebb DNS

károsító hatást a tőzeges talaj extraktuma okozta. Az eltérő talajtípusok közötti kimutatható különbség az eltérő talajszerkezet eredménye, mely eltérő mértékű adszorbcíót és kimosódást okoz. A genotoxikus hatás minden talajtípus esetében csökkent kis mértékben a 7. napra a 3. naphoz képest. Szintén kimutatható, bár nem szignifikáns volt a hatás csökkenése a 7. napon a szabadföldi minták esetében. Eme kísérlet során szignifikánsan mutagén hatást az ajánlott dózis 4, illetve 8-szorosával történő kezelés után detektáltunk a tarlón hagyott parcellák esetében.

A vizsgálatok során számos alkalommal tapasztalt szinergisztikus és antagonisztikus hatások megerősítik a keverék vegyületek monitorozásának fontosságát. Kísérleteink eredményei alátámasztják az egymástól eltérő tesztszervezetek párhuzamos alkalmazásának indokoltságát mind a toxicitási, mind a mutagenitás tesztek esetében. Az általunk alkalmazott comet, MTT és *Allium cepa* tesztek alkalmasnak bizonyultak növényvédő szerek és környezeti minták vizsgálatára is, így felhasználásuk az ökotoxikológiai rutinvizsgálatok során gyorsaságuk és relatív költséghatékonyságuk miatt javasolt.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam az általam vizsgált fenoxi-alkán-karbonsav típusú növényvédő szerek, hatóanyagaik, továbbá ezek bináris és ternáris keverékeinek *Allium cepa*-ra vonatkoztatott effektív koncentrációinak értékeit, morfológiai hatásait, meghatároztam mutációs faktorukat, valamint mitotikus indexüket. Szignifikáns mértékű kromoszóma aberrációs hatást mutattam ki a ternáris keverék esetében, míg a többi vizsgált hatóanyag nem mutatott a tesztben genotoxikus hatást. Megállapítottam, hogy a mitotikus index értékének alakulásában gyenge dózis-hatás megfigyelhető, vagyis a hatóanyagok növekvő koncentrációjával szemben kis mértékben csökkent a mitotikusan osztódó sejtek száma.
2. Meghatároztam az MTT teszt alkalmazásával a 2,4-D, MCPA, diklórprop és mekoprop, valamint az utóbbi 3 keverékének citotoxikus hatásait ponty epitheliális halsejteken 0,1-1000 mg/l nagyságrendben. Megállapítottam, hogy az egyedi hatóanyagok, illetve ternáris keverékük közül a mekoprop esetében 1-1000 mg/l-es dózisban szignifikáns citotoxikus hatás volt mérhető.
3. Az EPC comet teszt felhasználásával megvizsgáltam a fenoxi-alkán-karbonsav növényvédő szerek és azok hatóanyagainak hatásait. Megállapítottam, hogy a fenoxi-karbonsavak esetében a comet tesztben detektálható kromoszómatöréses mutációért nagy valószínűséggel a két szénatomos ecetsav ligandum a felelős, míg egy harmadik szénatom belépésével a mutagén hatás megszűnik.
4. Megvizsgáltam Optica trióval permetezett talajminták genotoxikus hatásait EPC comet teszttel. Megállapítottam, hogy a különböző talajtípusok extraktumai eltérő DNS károsító hatásúak az eltérő talajszerkezetnek köszönhetően, mely különböző mértékű adszorpciót és kimosódást okoz. Szabadföldi minták esetében szignifikáns genotoxikus hatást mutattam ki a 8 és 16 l/ha-al kezelt talajminta extraktumok esetében.
5. Optimalizáltam az EPC comet tesztet az eljárás során alkalmazott paraméterek, így az inkubációs idő, a tenyészedény és a tenyészmédium körültekintő megválasztásával. Kifejlesztettem az előzetesen lefagyasztott sejtszuszpenziót felhasználó EPC comet tesztet, mely technika lehetővé teszi a sejtet károsító tripszin használatának elkerülését.

NEW SCIENTIFIC RESULTS

1. Effective concentrations of studied phenoxy alcanoic acid herbicides and their active ingredients individually and in binary and ternary mixtures were determined. The agents' morphological effects, mutation factors and mitotic index on *Allium cepa* were assessed as well. Significant chromosome aberration effects were detectable in case of ternary mixture. Week dose-dependent effect was observable on the value of mitotic index, namely by increasing concentration of chemicals the number of mitotically dividing cells was decreased.
2. Cytotoxic effects of 2,4-D, MCPA, mecoprop and dichlorprop were assessed using MTT colorimetric assay on carp epithelium cells. Examining mecoprop significant effect was detectable when 1-1000 mg/l was applied.
3. Genotoxic effects of auxenic herbicides and their active ingredients were detectable using comet *in vitro* bioassay based on EPC cell line. In the EPC comet assay significant genotoxic effects were detectable in case of phenoxy acetic acids while no effect was recorded in case of phenoxy proprionic acids. The genotoxic potential is most likely caused by the carboxylic acid ligand which is capable of binding with two carbon atoms to the cell membrane receptor, whereas the introduction of the third methyl radical induces loss of binding affinity.
4. Potential genotoxic effects of Optica trio pesticide treated soil samples were assessed using EPC comet assay. Different soil types have different DNA damaging capacity due to their various structures, which caused different level of adsorption and leaching. In case of samples derived from field experiments significant genotoxic effects were detectable on soil extracts previously sprayed with 8 and 16 l/ha Optica trio respectively.
5. Comet assay was optimized by detailed investigation of the genotoxic effect of different experimental settings on the EPC cell line. Among the applied media data showed that Tris stabilized MEM growth medium is the most appropriate without addition of any PBS. From the tested culture dishes eppendorf tubes were found more suitable for these experiments than 24 well plates. The 24 hours incubation had no effect on cells. In order to avoid the harmful trypsin while handling cells, a new method was introduced using freshly defrozen cells.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom konzulensemnek, Taller Jánosnak a dolgozat javításában, valamint az egyetemi ügyintézésben nyújtott segítségéért.

Hatalmas köszönettel tartozom Jette Ranknak, témavezetőmnek a Roskilde Egyetemen, amiért lehetőséget nyújtott, hogy az általa vezetett laborban végezhessem a comet, MTT és *Allium cepa* tesztek.

Köszönöm opponenseimnek, Vértesi Adélnak és Lehel Józsefnek a dolgozat első változatának kijavítása során nyújtott számtalan konstruktív javaslatát és tanácsát.

Nagyon hálás vagyok Klara Jensennek az MTT és a comet teszt, valamint Anna Grete Windingnek az *Allium cepa* teszt betanításáért, és a tesztek optimalizációjában végzett munkám támogatásáért.

Köszönöm Kristian Sybergnek az eredmények statisztikai kiértékelésében nyújtott segítségét és a keverékek toxikológiájának megismertetését.

Barátomnak, Fejes Áginak köszönet jár a rengeteg támogatásért, és hogy mindig meghallgatott, akár szakmai, akár személyesebb hangvétellű beszélgetésre volt szükségem.

Köszönöm kollégámnak és barátomnak, Fekete Gábornak, hogy elindított a tudomány rögzös útján, és támogatta kezdeti, bizonytalan lépéseimet.

Mörtl Máriának és Juracsek Jutkának a talajmintákkal végzet kísérletekben nyújtott segítségükért, a megfelelő extrahálási módszer megtalálásáért, és baráti támogatásukért is hálával tartozom.

Köszönöm Anyukámnak és Mamámnak, hogy mindig hittek bennem, és támogattak.

Köszönöm Férjemnek, hogy minden pillanatban mellettem állt. Nélküle ez a dolgozat soha nem jöhetett volna létre.

IRODALOMJEGYZÉK

- Adamicza, Á., Boros, M., Jánossy, T., Kaszaki, J., Nagy, S., Szabó, A., Torday, C., Gaál, B., 2007. Állatkísérletek az orvostudományban. Egyetemi jegyzet, Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttan Intézet.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation research* 343, 121–35.
- Alexander, H.C., Gersich, F.M., Mayes, M.A., 1985. Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 35, 314–21.
- Amer, S.M., Aly, F. A., 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutation research* 494, 1–12.
- Ames, B., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F.D., 1973a. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 2281–5.
- Ames, B., Lee, F.D., Durston, W.E., 1973b. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 782–6.
- Anderson, K.J., Leighty, E.G., Takahashi, M.T., 1972. Evaluation of herbicides for possible mutagenic properties. *Journal of agricultural and food chemistry* 20, 649–56.
- Arnold, E.K., Beasley, V.R., 1989. The pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides: a literature review. *Veterinary and human toxicology* 31, 94–98.
- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N., Ahmad, W., 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation research* 514, 105–113.
- Aylward, L.L., Morgan, M.K., Arbuckle, T.E., Barr, D.B., Burns, C.J., Alexander, B.H., Hays, S.M., 2010. Biomonitoring data for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the United States and Canada: interpretation in a public health risk assessment context using Biomonitoring Equivalents. *Environmental health perspectives* 118, 177–81.
- Azqueta, A., Gutzkow, K.B., Brunborg, G., Collins, A.R., 2011. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation research* 724, 41–5.
- Babich, H., Borenfreund, E., 1991. Cytotoxicity and Genotoxicity assays with cultured fish cells : A Review. *Toxicology in Vitro* 5, 91–100.

- Backhaus, T., Altenburger, R., Arrhenius, A., Blanck, H., Faust M, Finizio A, Gramatica P, Grote, M., Junghans, M., Meyer W, Pavan M, Porsbring T, Scholze M, Todeschini R, Vighi M, Walter H, Grimme LH:, 2003. The BEAM project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Continental Shelf Research* 1757–69.
- Barbério, A., Voltolini, J.C., Mello, M.L.S., 2011. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology* 20, 927–35.
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated environmental assessment and management* 3, 364–72.
- Bernardini, G., Spinelli, O., Vismara, C., Presutti, C., Bolzacchini, E., Orlandi, M., Settini, R., 1996. Evaluation of the developmental toxicity of the pesticide MCPA and its contaminants phenol and chlorocresol. *Environmental toxicology and chemistry* 15, 754–760.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26, 585–615.
- Bond, G.G., Rossbacher, R., 1993. A review of potential human carcinogenicity of the chlorophenoxy herbicides MCPA, MCPP, and 2,4-DP. *British journal of industrial medicine* 50, 340–8.
- Brinkmann, C., Eisentraeger, A., 2008. Completely automated short-term genotoxicity testing for the assessment of chemicals and characterisation of contaminated soils and waste waters. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 211–217.
- Bronsema, F.B.F., van Oostveen, W.J.F., Prinsen, E., van Lammeren, A.A.M., 1998. Distribution of [¹⁴C] dichlorophenoxyacetic acid in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 17, 81–88.
- Bukowska, B., 2006. Toxicity of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. *Polish J. of Environ. Stud.* 15, 365–374.
- Carson, R., 1962. *Silent spring*. Houghton Mifflin, Boston.
- Charles, J.M., Cunny, H.C., Wilson, R.D., Bus, J.S., Lawlor, T.E., Cifone, M. a, Fellows, M., Gollapudi, B., 1999a. Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation research* 444, 207–16.
- Charles, J.M., Cunny, H.C., Wilson, R.D., Ivett, J.L., Murli, H., Bus, J.S., Gollapudi, B., 1999b. In vivo micronucleus assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation research* 444, 227–34.

- Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and molecular mutagenesis* 29, 277–88.
- Cobb, A.H., Reade, J.P.H., 2010. Auxin-type herbicides, in *Herbicides and Plant Physiology*, second. ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–51.
- Comoretto, L., Arfib, B., Talva, R., Chauvelon, P., Pichaud, M., Chiron, S., Höhener, P., 2008. Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): field study and modeling. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 151, 486–93.
- Cotelle, S., Féraud, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and molecular mutagenesis* 34, 246–55.
- Dearfield, K.L., Cimino, M.C., Custer, L., Czich, A., Harvey, J.S., Hester, S., Kim, J.H., Kirkland, D., Levy, D.D., Lorge, E., Moore, M.M., 2011. Follow-up actions from positive results of in vitro genetic toxicity testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 204, 177–204.
- Deventer, K., 1996. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 56, 911–8.
- European Commission, 2006, n.d. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/4, Brussels.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339, 37–59.
- Farah, M.A., Ateeq, B., Ahmad, W., 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *The Science of the total environment* 364, 200–14.
- Fijan, N., Sulimanović, D., Bearzotti, M., Muzinić, D., Zwillenberg, L.O., Chilmonczyk, S., Vautherot, J.F., de Kinkelin, P., 1983. Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie* 134, 207–220.
- Filep, G., Kovács, B., Szabó, I., 1999. A káros anyagok reakciói a hulladékot befogadó kőzetekkel. *Tanulmánykötet, Magyar Állami Földtani Intézet, Budapest.*

- Filkowski, J., Besplug, J., Burke, P., Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., 2003. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. *Mutation research* 542, 23–32.
- Fiskesjö, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99–112.
- Frank, R., Logan, L., 1988. Pesticide and Industrial Chemical Residues at the Moutj of the Grand, Saugeen and Thames Rivers, Ontario, Canada, 1981-85. *Arch Environ Contam Toxicol* 754, 741–754.
- Frumkin, H., 2003. Agent Orange and Cancer: An Overview for Clinicians. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 53, 245–255.
- Fu, F., Xiao, L., Wang, W., Xu, X., Xu, L., Qi, G., Chen, G., 2009. Study on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic sodium (MCPA sodium) in natural agriculture-soils of Fuzhou, China using capillary electrophoresis. *The Science of the total environment* 407, 1998–2003.
- Gedik, C.M., Collins, A., 2005. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 82–4.
- Gerlier, D., Thomasset, N., 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods* 94, 57–63.
- Gollapudi, B.B., Charles, J.M., Linscombe, V.A., Day, S.J., Bus, J.S., 1999. Evaluation of the genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. *Mutation research* 444, 217–25.
- Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological reviews* 47, 331–85.
- Grossmann, K., 2000. Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends in plant science* 5, 506–8.
- Gruiz, K., Horváth, B., Molnár, M., 2001. *Környezettoxikologia*. Műegyetem Kiadó.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S., 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13, 89–94.
- Herzog, G.I., Solgi, G., Wiegmann, D.S., Nienhaus, C., Schrezenmeier, H., Yildiz, T., Lotfi, R., 2011. Quality of tumor lysates used for pulsing dendritic cells is influenced by the method used to harvest adherent tumor cells. *BMC research notes* 4, 153.

- Holland, N.T., Duramad, P., Rothman, N., Figgs, L.W., Blair, A., Hubbard, A., Smith, M.T., 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation research* 521, 165–78.
- Houk, V.S., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation research* 277, 91–138.
- Huang, H.-L., Hsing, H.-W., Lai, T.-C., Chen, Y.-W., Lee, T.-R., Chan, H.-T., Lyu, P.-C., Wu, C.-L., Lu, Y.-C., Lin, S.-T., Lin, C.-W., Lai, C.-H., Chang, H.-T., Chou, H.-C., Chan, H.-L., 2010. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of biomedical science* 17, 36.
- IPCS International Programme on Chemical Safety Health and Safety Guide no. 5. 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-d) health and safety guide, 1987. . URL <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg005.htm>
- Ibrahim, M.A., Bond, G.G., Burke, T.A., Cole, P., Dost, F.N., Enterline, P.E., Gough, M., Greenberg, R.S., Halperin, W.E., McConnell, E., 1991. Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2,4-D. *Environmental health perspectives* 96, 213–22.
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental pollution* 132, 279–87.
- Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation research* 498, 67–77.
- Kammann, U., Riggers, J.C., Theobald, N., Steinhart, H., 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation research* 467, 161–8.
- Kappas, A., 1988. On the mutagenic and recombinogenic activity of certain herbicides in *Salmonella typhimurium* and in *Aspergillus nidulans*. *Mutation research* 204, 615–21.
- Kaya, B., Creus, a, Yanikoğlu, a, Cabré, O., Marcos, R., 2000. Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environmental and molecular mutagenesis* 36, 40–6.
- Károly, G., Györfi, L., Ocskó, Z., 2001. Felszíni vizeink növényvédőszer-szennyezettségi vizsgálata. *Növényvédelem* 37, 539–545.
- Kidd, H., James, D., 1991. *The Agrochemicals handbook*, 3rd edn. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK.

- Kirkland, D.J., Henderson, L., Marzin, D., Müller, L., Parry, J.M., Speit, G., Tweats, D.J., Williams, G.M., 2005. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutation research* 588, 88–105.
- Kiskinis, E., Suter, W., Hartmann, A., 2002. High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis* 17, 37–43.
- Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T., Nagata, T., 2000. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Reports* 19, 551–557.
- Kocan, R.M., Sabo, K.M., Landolt, M.L., 1985. Cytotoxicity/genotoxicity: the application of cell culture techniques to the measurement of marine sediment pollution. *Aquatic Toxicology* 6, 165–177.
- Kolmodin-Hedman, B., Höglund, S., Akerblom, M., 1983. Studies on phenoxy acid herbicides. I. Field study. Occupational exposure to phenoxy acid herbicides (MCPA, dichlorprop, mecoprop and 2,4-D) in agriculture. *Archives of toxicology* 54, 257–65.
- Koreck, A., Szechenyi, A., Morocz, M., Cimpean, A., Bella, Z., Garaczi, E., Raica, M., Olariu, T.R., Rasko, I., Kemeny, L., 2007. Effects of intranasal phototherapy on nasal mucosa in patients with allergic rhinitis. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 89, 163–9.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N., 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell biology and toxicology* 25, 53–64.
- Kurt-Karakus, P.B., Bidleman, T.F., Muir, D.C.G., Struger, J., Sverko, E., Cagampan, S.J., Small, J.M., Jantunen, L.M., 2010. Comparison of concentrations and stereoisomer ratios of mecoprop, dichlorprop and metolachlor in Ontario streams, 2006-2007 vs. 2003-2004. *Environmental pollution* 158, 1842–9.
- Lamche, G., Burkhardt-Holm, P., 2000. Nonylphenol provokes a vesiculation of the Golgi apparatus in three fish epidermis cultures. *Ecotoxicology and environmental safety* 47, 137–48.
- Lannan, C.N., 1994. Fish cell culture: A protocol for quality control. *Journal of Tissue Culture Methods* 16, 95–98.
- Lazartigues, A., Banas, D., Feidt, C., Brun-Bellut, J., Thomas, M., 2011. Pesticide pressure and fish farming in barrage pond in Northeastern France Part I: site characterization and water quality. *Environmental science and pollution research international* 19, 2802–12.
- Lee, W.R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Halle, E.S., Würzler, F.E., Zimmering, S., 1983. The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila*

- melanogaster. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation research* 123, 183–279.
- Legault, R., Blaise, C., Rokosh, D., Chong-Kit, R., 1994. Comparative assessment of the SOS Chromotest kit and the Mutatox test with the *Salmonella* plate incorporation (Ames test) and fluctuation tests for screening genotoxic agents. *Environmental Toxicology & Water Quality* 9, 45–57.
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation research* 682, 71–81.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24, 471–486.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Naunyn-schmiedebergs archiv fur experimentelle pathologie und pharmakologi.* 114, 313–26.
- Madrigal-Bujaidar, E., Hernández-Ceruelos, A., Chamorro, G., 2001. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 39, 941–6.
- Mahadevan, B., Snyder, R.D., Waters, M.D., Danielbenz, R., Kemper, R., Tice, R., Richard, A., 2011. Genetic toxicology in the 21th century: reflections and future directions. *Environmental and molecular mutagenesis* 354, 339–354.
- Maloschik, E., Ernst, A., Hegedűs, G., Darvas, B., Székács, A., 2007. Monitoring water-polluting pesticides in Hungary. *Microchemical Journal* 85, 88–97.
- Maloschik, E., Mörtl, M., Székács, A., 2010. Novel derivatisation technique for the determination of chlorophenoxy acid type herbicides by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397, 537–48.
- Mccarthy, I., Gómez, M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Río, L.A.D., 2004. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *. *Plant, Cell and Environment* 27, 1135–1148.
- Meister, R.T., 1994. *Farm Chemicals Handbook '94*. Meister Publishing Company, Willoughby, OH.
- Merini, L.J., Cuadrado, V., Flocco, C.G., Giulietti, A.M., 2007. Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: a microcosm study. *Chemosphere* 68, 259–65.
- Mersch-Sundermann, V., Dickgiesser, N., Hablitzel, U., Gruber, B., 1988. [The mutagenicity of organic microcontaminants in the environment. I. The mutagenicity of selected herbicides and insecticides in the *Salmonella* microsome

- test (Ames test) with regard to the pathogenic potency of contaminated ground and drinking water]. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B. 186, 247–60.
- Meylan, W.M., Howard, P.H., 1993. Computer estimation of the atmospheric gas-phase reaction rate of organic compounds with hydroxyl radicals and ozone. *Chemosphere* 26, 2293–2299.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55–63.
- Munro, I., Carlo, G., Orr, J., Sund, K., Wilson, R., Kennepohl, E., Lynch, B., Jablinske, M., Lee, N., 1992. A Comprehensive, Integrated Review and Evaluation of the Scientific Evidence Relating to the Safety of the Herbicide 2,4-D. *International Journal of Toxicology* 11, 559–664.
- Nacci, D.E., Cayula, S., Jackim, E., 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* 35, 197–210.
- Nechay, O., Pap, M., 1962. *Növényvédelem.*, 2. kiad. ed. Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest.
- Nemzeti Rákellenes Program, 2006. Kiadta az Egészségügyi Minisztérium megbízásából az Egészségügyi Szakképző és Továbbképző Intézet, Budapest.
- Nestorovska-Krsteska, A., Mirceska, M., Aaron, J., Zdravkovski, Z., 2008. Determination of dimethoate, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, Mecoprop and linuron pesticides in environmental waters in republic of macedonia by high performance liquid chromatography. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 27, 25–33.
- Nielsen, M.H., Rank, J., 1994. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas* 121, 249–54.
- Nortcliff, S., Chap, U.K., Terytze, K., Republic, F., Bredemeier, M., Litz, N., Mayer, R., Norbert, M., Ag, R., Forstwirtschaft, A., 2006. Soil, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- OECD, 1997a., Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.
- OECD, 1997b. Test No. 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing .
- Ocskó, Z., Erdős, G., Molnár, J., 2009. *Növényvédőszeres, Termésmenvelő Anyagok* 2009. I-II., Földművelésügyi Minisztérium, Budapest.

- Ocskó, Z., Erdős, G., Molnár, J., 2013. Növényvédőszeres és termésnövelő anyagok I.-II. 2013. Földművelésügyi Minisztérium, Budapest.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation research* 567, 109–49.
- Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M., 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and molecular mutagenesis* 26, 345–56.
- Papaefthimiou, C., Cabral, M.D.G., Mixailidou, C., Viegas, C. a, Sá-Correia, I., Theophilidis, G., 2004. Comparison of two screening bioassays, based on the frog sciatic nerve and yeast cells, for the assessment of herbicide toxicity. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 23, 1211–8.
- Peralta Soler, A., Knudsen, K.A., Tecson-Miguel, A., McBrearty, F.X., Han, A.C., Salazar, H., 1997. Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors. *Human pathology* 28, 734–9.
- Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 30, 2831–7.
- Peterson, H.G., Boutin, C., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., Moody, M.J., 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology* 275–292.
- Petrovic, A.M., Gutenmann, W.H., Ebel, J.G., Lisk, D.J., 1993. Leaching of mecoprop herbicide through turfgrass soils. *Chemosphere* 26, 1541–1547.
- Radić, S., Stipanicev, D., Vujčić, V., Rajčić, M.M., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B., 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *The Science of the total environment* 408, 1228–33.
- Raju, T.N., 1999. The Nobel chronicles. 1933: Thomas Hunt Morgan (1866-1945). *Lancet* 353, 157.
- Rank, J., Jensen, K., 2003. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and environmental safety* 54, 323–9.
- Rank, J., Nielsen, M.H., 1993. A Modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas* 118, 49–53.
- Rank, J., Nielsen, M.H., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation research* 390, 121–7.

- Rank, J., Nielsen, M.H., 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation research* 418, 113–9.
- Reiczigel J., Harnos A., Solymosi N, 2010. *Biostatiztika nem statisztikusoknak*, 2. ed, Pars Kft., Budapest. Pars Kft., Budapest.
- Rheinwald, J.G., Green, H., 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331–43.
- Rieder, C.L., Palazzo, R.E., 1992. Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of cell science* 102 (Pt 3, 387–92.
- Salagovic, J., Gilles, J., Verschaeve, L., Kalina, I., 1996. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia biologica* 42, 17–21.
- Seiler, J.P.P., 1978. The genetic toxicology of phenoxy acids other than 2,4,5-T. *Mutation research* 55, 197–226.
- Shaposhnikov, S.A., Salenko, V.B., Brunborg, G., Nygren, J., Collins, A.R., 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis* 29, 3005–12.
- Shiba, Y., Ohshima, T., Sato, M., 1998. Growth and morphology of anchorage-dependent animal cells in a liquid/liquid interface system. *Biotechnology and bioengineering* 57, 583–9.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 175, 184–91.
- Sinkó, I., Mórocz, M., Zádori, J., Kokavszky, K., Raskó, I., 2005. Effect of cigarette smoking on DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay. *Reproductive toxicology*. 20, 65–71.
- Soderquist, C.J., Crosby, D.G., 1975. Dissipation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) in a rice field. *Pesticide Science* 6, 17–33.
- Stingl, J., Emerman, J.T., Eaves, C.J., 2005. Enzymatic dissociation and culture of normal human mammary tissue to detect progenitor activity. *Methods in molecular biology*. 290, 249–63.
- Superti, F., Seganti, L., Orsi, N., 1988. Effect of cellular inhibitors on the infection of various susceptible cells with vesicular stomatitis virus. *Acta virologica* 32, 487–93.

- Sura, S., Waiser, M., Tumber, V., Farenhorst, A., 2012. Effects of herbicide mixtures on microbial communities from a prairie wetland ecosystem: a whole wetland approach. *Science of Total Environment* 435-436, 34-43.
- Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., Forbes, V.E., 2008. Mixture Toxicity of Three Toxicants with Similar and Dissimilar Modes of Action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety* 69, 428–436.
- Tejada, M., García-Martínez, A.M., Gómez, I., Parrado, J., 2010. Application of MCPA herbicide on soils amended with biostimulants: short-time effects on soil biological properties. *Chemosphere* 80, 1088–94.
- Terényi, S., Josepovits, G., Matolcsy, G., 1967. *Növényvédelmi kémia*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Thorpe, K.L., Gross-Sorokin, M., Johnson, I., Brighty, G., Tyler, C.R., 2006. An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents. *Environmental health perspectives* 114, 90–7.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35, 206–21.
- Tichý, M., Borek-Dohalský, V., Rucki, M., Reitmajer, J., Feltl, L., 2002. Risk assessment of mixtures: possibility of prediction of interaction between chemicals. *International archives of occupational and environmental health* 75 Suppl, S133–6.
- Tong, W., 1974. The isolation and culture of thyroid cells. *Methods in enzymology* 32, 745–58.
- Tscheu-Schluter, M., 1974. Acute toxicity of herbicides for selected aquatic organisms. i. synthetic growth-promoting herbicides, phenoxy-carboxylic acids. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 2, 139–159.
- US EPA, 1988a. U. S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides and Toxic Substances. 1988. Fact Sheet No. 192: 2-(2-Methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid and its salts and esters. U.S. EPA. Washington, DC.
- US EPA, 1988b. US Environmental Protection Agency. Guidance for the reregistration of pesticide products containing 2,4-DP as the active ingredient. U.S. EPA Washington, DC,.
- de Veer, I., Moriske, H.J., Rüden, H., 1994. Photochemical decomposition of organic compounds in water after UV-irradiation: investigation of positive mutagenic effects. *Toxicology letters* 72, 113–9.

- Venkov, P., Topashka-Ancheva, M., Georgieva, M., Alexieva, V., Karanov, E., 2000. Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. *Archives of Toxicology* 74, 560–566.
- Wei, Y.N., Wang, Q.Q., Gao, T.T., Kong, M., Yang, K.K., An, Y., Jiang, S.Y., Li, J., Cheng, X.J., Chen, X.G., 2013. 3-D culture of human umbilical vein endothelial cells with reversible thermosensitive hydroxybutyl chitosan hydrogel. *Journal of materials science. Materials in medicine* 24, 1781–7.
- White, P.A., Claxton, L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation research* 567, 227–345.
- Wiklund, S.J., Agurell, E., 2003. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 18, 167–75.
- Wilson, H.R., Warnick, A.C., Gutierrez, J.H., 1969. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. *Poultry science* 48, 714–7.
- Wolf, K., Quimby, M.C., 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science (New York, N.Y.)* 135, 1065–6.
- Zahm, S.H., Blair, A., 1992. Pesticides and Non-Hodgkin 's Lymphoma. *Cancer Research (Suppl.)* 52, 5485–5488.
- Zana, M., Szécsényi, A., Czibula, A., Bjelik, A., Juhász, A., Rimanóczy, A., Szabó, K., Vetró, A., Szűcs, P., Várkonyi, A., Pákáski, M., Boda, K., Raskó, I., Janka, Z., Kálmán, J., 2006. Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 345, 726–33.
- Zeiger, E., 2003. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 543, 191–194.
- Zeiger, E., 2010. Historical Perspective on the Development of the Genetic Toxicity Test Battery in the United States. *Environmental and molecular mutagenesis* 791, 781–91.
- Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., 2004. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology* 200, 39–47.
- Zimmermann, F.K., von Borstel, R.C., von Halle, E.S., Parry, J.M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R., Loprieno, N., 1984. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation research* 133, 199–244.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D: 2,4-diklórfenoxi-ecetsav

CA: kromoszóma aberráció

DMSO: dimetil-szulfoxid

EC: effektív koncentráció

EC₅₀: közepes effektív koncentráció, a maximális hatás 50%-át eredményező dózis

EDTA: etilén-diamid-tetraecetsav

EPC: *Epithelium papillosum cyprini*

FCS: *fetal cow serum*; foetális borjú szérum

MCPA: 4-kloro-*o*-toliloxiecetsav

MEM: minimum esszenciális médium

MH: maleinsav-hidrazid

MI: mitotikus index

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid

NOEL: *non observable effect level*; legnagyobb, még hatást ki nem váltó dózis

PBS: *phosphate buffered saline*, foszfát-pufferelt sóoldat

REACH: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*; a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról szóló rendelet

MELLÉKLET

1. táblázat: Mért átlagos gyökérhossz *Allium cepa* testben

	Alkalmazott dózisok (mg/l)					
	0,001	0,01	0,1	1	5	kontroll
	Mért átlagos gyökérhossz (cm)					
Dezormon	4,1	4,3	2	0	0	4,1
Optica trió	4,4	3,5	1,1	0	0	4,1
2,4-D	6,4	5,2	2,6	0	0	5,9
MCPA	5	4,8	1	0	0	6
Mekoprop-P	5	3,9	0,7	0	0	4,8
Diklórprop-P	5	4	1	0	0	3,3

2. táblázat: Fenoxi-alkánsav herbicidek és hatóanyagaik vizsgálatának eredménye comet tesztben a csóva %-os DNS tartalmára vonatkozóan, *= P <0,001; **= P <0,01; ***= P <0,05

Vizsgált anyag		A csóva %-os DNS tartama								
		Alkalmazott dózis (mg/l)								
		Negatív kontroll	Pozitív kontroll	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
Dezormon	1	7.65	78.86	-	46.50	6.22	5.29	5.68	11.45	-
	2	4.90	69.63	-	38.96	4.86	6.37	4.33	8.03	-
	3	6.84	69.58	-	49.88	6.03	13.06	11.29	13.35	-
	átlag	6.46	72.69	-	45.11	5.70	8.24	7.10	10.94	-
	SD	0.41	5.34	-	5.59	0.74	4.21	3.69	2.70	-
			***		***					
Optica trió	1	4.71	85.24	50.62	6.66	13.07	13.04	5.79	-	-
	2	3.74	92.10	23.67	26.12	13.57	8.59	11.51	-	-
	3	3.93	80.96	37.00	14.39	12.30	14.31	10.64	-	-
	átlag	4.13	86.10	37.10	15.72	12.98	11.98	9.31	-	-
	SD	0.51	5.62	13.48	9.80	0.64	3.00	3.08	-	-
			***	**						
2,4-D	1	3.48	70.21	-	-	64.36	38.67	33.35	13.74	5.36
	2	3.77	71.43	-	-	52.79	21.35	19.71	15.34	6.17
	3	3.76	75.16	-	-	49.54	38.72	11.85	15.34	5.25
	átlag	3.67	72.27	-	-	55.56	32.91	21.64	14.81	5.59
	SD	0.16	2.58	-	-	7.79	10.01	10.88	0.92	0.50
			***		***	**				
MCPA	1	3.18	77.04	-	-	17.24	3.52	2.92	5.84	3.61
	2	5.59	71.42	-	-	8.74	4.54	4.18	3.77	3.31
	3	4.32	75.20	-	-	9.07	4.98	5.13	2.28	3.42
	átlag	4.37	74.55	-	-	11.68	4.35	4.07	3.96	3.45
	SD	1.206	2.865	-	-	4.81	0.75	1.11	1.78	0.15
			***		*					
Mekoprop	1	5.84	68.94	-	-	7.30	8.03	5.67	3.47	6.26
	2	1.97	68.21	-	-	6.14	5.00	8.71	2.89	4.87
	3	3.12	64.51	-	-	5.19	8.80	7.11	5.62	5.27
	átlag	3.64	67.22	-	-	6.21	7.28	7.16	3.99	5.47
	SD	1.99	2.38	-	-	1.06	2.01	1.52	1.44	0.72

Diklórprop	1	4.60	36.39	-	-	15.94	12.72	7.70	12.84	5.30
	2	3.29	52.10	-	-	12.37	19.17	8.88	4.72	10.82
	3	6.66	74.18	-	-	6.25	19.87	2.16	13.11	6.45
	átlag	4.85	54.22	-	-	11.52	17.25	6.25	10.22	7.52
	SD	1.70	18.98	-	-	4.90	3.94	3.58	4.77	2.91

Ternáris keverék	1	3.42	76.79	-	20.95	7.58	12.35	9.35	15.68	-
	2	3.50	75.24	-	9.57	11.78	9.45	11.30	15.82	-
	3	5.83	62.18	-	14.63	9.01	15.64	8.03	4.12	-
	átlag	4.25	71.40	-	15.05	9.46	12.48	9.56	11.87	-
	SD	1.37	8.03	-	5.70	2.14	3.10	1.65	6.72	-

3. táblázat: Fenoxi-alkánsav herbicidek és hatóanyagaik vizsgálatának eredménye comet testben az átlagos csóvamomentumra vonatkozóan, *= P <0,001; **= P <0,01; ***= P <0,05

Vizsgált anyag		Átlagos csóvamomentum								
		Alkalmazott dózis (mg/l)								
		Negatív kontroll	Pozitív kontroll	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
Dezormon	1.	0.86	18.04	-	10.06	0.7	0.46	0.66	1.36	-
	2.	0.51	14.03	-	8	0.56	0.66	0.53	1.13	-
	3.	0.75	13.1	-	9.79	0.72	1.69	1.4	2.01	-
	átlag	0.70	15.05	-	9.28	0.66	0.94	0.86	1.5	-
	SD	0.18	2.62	-	1.12	0.08	0.66	0.46	0.46	-
			***		***					
Optica trió	1.	0.41	21.47	12.94	0.59	1.60	1.93	0.57	-	-
	2.	0.31	29.83	5.04	5.04	1.86	1.40	1.84	-	-
	3.	0.37	29.11	8.00	2.52	2.08	2.13	1.52	-	-
	átlag	0.36	26.80	8.66	2.71	1.85	1.82	1.31	-	-
	SD	0.05	4.62	3.99	2.23	0.24	0.37	0.66	-	-
			***	*						
2,4-D	1.	0.31	14.71	-	-	14.90	6.65	6.45	2.05	0.67
	2.	0.32	15.91	-	-	9.45	3.19	3.10	2.61	0.78
	3.	0.27	16.46	-	-	9.81	6.94	2.04	1.81	0.59
	átlag	0.30	15.69	-	-	11.39	5.59	3.86	2.16	0.68
	SD	0.03	0.89	-	-	3.05	2.09	2.30	0.41	0.09
			***		***	*				
MCPA	1.	0.29	19.36	-	-	3.32	0.43	0.28	0.33	0.43
	2.	0.73	18.80	-	-	1.17	0.59	0.35	0.54	0.34
	3.	0.47	17.82	-	-	1.15	0.56	0.57	0.35	0.33
	átlag	0.50	18.66	-	-	1.88	0.53	0.40	0.41	0.37
	SD	0.22	0.77	-	-	1.24	0.08	0.15	0.11	0.05

Mekoprop	1.	0.63	15.34	-	-	1.00	1.16	0.71	0.33	0.84
	2.	0.16	13.19	-	-	0.85	0.67	1.11	0.24	0.43
	3.	0.27	13.90	-	-	0.76	1.16	0.81	0.64	0.52
	átlag	0.35	14.14	-	-	0.87	1.00	0.88	0.40	0.60
	SD	0.24	1.09	-	-	0.12	0.28	0.20	0.21	0.22

Diklórprop	1.	0.38	6.22	-	-	2.66	1.86	0.87	1.91	0.60
	2.	0.29	9.86	-	-	1.86	3.07	1.10	0.48	1.56
	3.	0.60	17.21	-	-	0.76	3.32	0.18	2.07	1.32
	átlag	0.42	11.10	-	-	1.76	2.75	0.72	1.49	1.16
	SD	1.70	18.98	-	-	4.90	3.94	3.58	4.77	2.91

Ternáris keverék	1.	0.28	16.60	-	3.38	0.89	2.09	1.23	2.67	-
	2.	0.33	17.91	-	1.24	1.57	1.06	1.61	2.51	-
	3.	0.59	14.80	-	2.02	1.15	2.30	1.14	0.38	-
	átlag	0.40	16.43	-	2.22	1.21	1.82	1.33	1.86	-
	SD	0.16	1.56	-	1.08	0.34	0.66	0.25	1.28	-

4. táblázat: Fenoxi-alkánsav herbicidek és hatóanyagaik vizsgálatának eredménye comet tesztben a csóva hosszára vonatkozóan, *= P <0,001; **= P <0,01; ***= P <0,05

Vizsgált anyag		Csóva hossza								
		Alkalmazott dózis (mg/l)								
		Negatív kontroll	Pozitív kontroll	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01
Dezormon	1.	14.74	42.55	-	34.6	13.85	14.24	15.46	17.87	-
	2.	15.39	37.55	-	30.67	15.38	15.28	15.91	16.54	-
	3.	14.66	35.24	-	34.26	15.36	17.6	16.39	18.64	-
	átlag	14.93	38.47	-	33.17	14.86	15.76	15.92	17.68	-
	SD	0.41	3.73	-	2.17	0.87	1.72	0.46	1.06	-
			***		***					
Optica trió	1.	14.48	46.51	39.37	15.23	17.66	19.20	16.50	-	-
	2.	13.77	56.05	24.26	24.97	17.36	20.89	18.98	-	-
	3.	14.73	56.52	30.00	22.53	19.91	18.72	18.88	-	-
	átlag	14.33	53.03	31.21	20.91	18.31	19.60	18.12	-	-
	SD	0.49	5.64	7.62	5.06	1.38	1.14	1.40	-	-
			***	*						
2,4-D	1.	14.07	39.91	-	-	43.11	30.25	35.75	20.05	16.49
	2.	13.95	41.47	-	-	33.26	24.77	22.71	19.49	16.18
	3.	13.74	42.59	-	-	35.61	24.77	24.01	19.49	16.87
	átlag	13.92	41.32	-	-	37.32	26.60	27.49	19.68	16.51
	SD	0.16	1.34	-	-	5.14	3.16	7.18	0.32	0.34
			***		***	**	**			
MCPA	1.	15.82	47.87	-	-	22.43	15.56	14.70	15.58	15.62
	2.	17.48	48.14	-	-	17.25	17.36	14.57	16.07	15.63
	3.	16.56	45.06	-	-	17.26	16.53	17.07	15.94	15.65
	átlag	16.62	47.02	-	-	18.98	16.48	15.45	15.87	15.63
	SD	0.83	1.70	-	-	2.98	0.90	1.40	0.25	0.01

Mekoprop	1.	15.67	40.59	-	-	16.49	17.58	15.56	15.02	17.65
	2.	13.67	36.28	-	-	13.93	15.25	16.55	14.61	13.90
	3.	14.11	38.97	-	-	14.62	16.19	14.94	15.82	15.77
	átlag	14.48	38.61	-	-	15.02	16.34	15.68	15.15	15.78
	SD	0.60	1.26	-	-	0.76	0.68	0.47	0.35	1.08

Diklórprop	1.	13.99	30.63	-	-	21.66	20.74	16.95	19.94	15.41
	2.	14.44	32.88	-	-	21.80	20.83	18.31	14.45	19.60
	3.	13.62	45.94	-	-	15.85	21.21	15.59	19.26	29.03
	átlag	14.02	36.48	-	-	19.77	20.93	16.95	17.88	21.35
	SD	1.70	8.98	-	-	1.90	0.94	1.58	2.77	2.91

Ternáris keverék	1.	14.58	39.97	-	22.86	18.26	19.79	19.11	19.83	-
	2.	15.23	42.70	-	17.90	17.70	15.78	19.12	20.62	-
	3.	15.21	42.86	-	20.53	18.17	21.14	18.35	14.89	-
	átlag	15.01	41.84	-	20.43	18.04	18.90	18.86	18.45	-
	SD	0.37	1.62	-	2.48	0.30	2.78	0.44	3.10	-

5.táblázat: Forgalomban lévő fenoxi-ecetsav hatóanyagok és –készítmények, valamint felhasználási területük (forrás: Ocskó és mtsai, 2013)

Hatóanyag	Készítmény	Felhasználási terület
2,4-D	DEZORMON	gabonafélék, kukorica
	DIKAMIN 720 WSC	kalászosok (kivéve sörárpa), kukorica, legelő, rét
	DIKAMIN D	kalászosok (kivéve sörárpa), kukorica, legelő
	DIKONIRT	kalászosok (kivéve sörárpa), kukorica
	ESTERON 60	kalászosok (kivéve sörárpa), kukorica, legelő, rét
	U 46 D-FLUID SL	kalászosok (kivéve sörárpa), kukorica
	2,4 D AMINSÓ 450 SL	kalászosok, kukorica, legelő
	DICOPUR D PRIM	kukorica
	DMA-6	kalászosok, kukorica, legelő, rét
	SOLUTION	kalászosok (kivéve sörárpa), kukorica, legelő, rét
	SYRIUS	búza (őszi), kukorica
	MATON 600	kalászosok, kukorica, legelő, rét
2,4-D + floraszulam	MUSTANG SE	Kalászosok (kivéve sörárpa), fénymag, kukorica (takarmány)
MCPA	JAMBOL M PRIM	almatermésűek, kalászosok, csonthéjasok, fénymag, szőlő
	MECOMORN 750 SL	kalászosok, gyümölcsös, köles, legelő, len, rét, rizs, szőlő
	U-46 M FLUID	kalászosok, fénymag, gyümölcsös, köles, legelő, len, rét, rizs, szőlő
	AGROXONE 75	almatermésűek, kalászosok, fénymag, köles, legelő, len, rét, rizs, szőlő
	DANACETÁT	árpa (tavaszi), búza (őszi)
	MECAPHAR	almatermésűek, kalászosok, köles, legelő, len, rét,
	MECAPHAR 750	rizs, szőlő
	TRITON 320 SL	kalászosok
U 46 M PLUS 750 SL	kalászosok, köles, legelő, olajlen, rét, rizs, rostlen	
MCPA + diklórprop	BUDAMIX WSC	árpa (őszi), búza (őszi)

5.táblázat, folytatás: Forgalomban lévő fenoxi-propionsav hatóanyagok és – készítmények, valamint felhasználási területük (forrás: Ocskó és mtsai, 2013)

Hatóanyag	Készítmény	Felhasználási terület
mekoprop-P	DUPLOSAN KV	kalászosok
mekoprop-p (K-só)	OPTICA	
mekoprop-P + dikamba + ioxinil	GYOM-STOP	gyep
mekoprop-P + MCPA	MATRIGAL	kalászosok
mekoprop-P + diklórprop-P + MCPA	OPTICA TRIO	
mekoprop-P + karfentrazon	AURORA SUPER SG	árpa (őszi), búza (őszi)
diklórprop-P	DUPLOSAN DP	kalászosok
diklórprop-P + mekoprop-P	KEROLAND L	gyep