

PANNON EGYETEM
ÁLLAT-ÉS AGRÁRKÖRNYEZET-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
Iskolavezető: Prof. Anda Angéla DSc

**PERZISZTENS NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK HATÁSTARTAM- ÉS
LEBOMLÁSVIZSGÁLATAI**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Készítette:

FEJES ÁGNES

DOI: 10.18136/PE.2015.578

Témavezetők:

FEKETE GÁBOR, PhD
Prof. **ANDA ANGÉLA, DSc**

Prof. **NÁDASI MIKLÓS, CSc†**

BUDAPEST

2014

PERZISZTENS NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK HATÁSTARTAM- ÉS LEBOMLÁSVIZSGÁLATAI

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:
Fejes Ágnes

Készült a Pannon Egyetem, Georgikon Kar,
Állat- és Agrárkörnyezet-tudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezetők: Dr. Fekete Gábor és
Prof. Anda Angéla

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

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.

Keszthely,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

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

.....
Az EDHT elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

KIVONATOK	6
MAGYAR NYELVŰ KIVONAT	6
SUMMARY.....	8
ZUSAMMENFASSUNG	9
1. BEVEZETÉS	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
2.1. A NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK A MEZŐGAZDASÁG GYAKORLATÁBAN.....	12
2.1.1. Növényvédő szerek felhasználása.....	12
2.1.2. Növényvédő szerek használatának környezeti aggályai	14
2.1.3. Víz- és talajszennyező növényvédő szerek	16
2.1.4. Szennyezések kimutatására alkalmazott analitikai eljárások.....	21
2.1.5. Szennyezések káros hatásának kimutatására alkalmazott toxikológiai eljárások	24
2.2. A CRY-TOXINOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE.....	26
2.2.1. A Cry4-toxin felhasználása	29
2.2.2. A Cry1Ab-, Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinok felhasználása.....	31
2.2.3. A Cry-toxint termelő növények és a Cry-toxintartalmú készítmények elterjedése	35
2.3. A KÍSÉRLETI ÁLLATOK.....	38
2.3.1. Nagy vízbolha (<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820).....	38
2.3.2. Egyiptomi csípőszúnyog (<i>Aedes aegypti</i> L., 1762)	39
2.3.3. Zebradánio (<i>Danio rerio</i> Hamilton-Buchanan, 1822)	39
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	41
3.1. IPARI ÉS MEZŐGAZDASÁGI EREDETŰ KÉMIAI SZENNYEZÉSEK KIMUTATÁSA ÉS HATÁSVIZSGÁLATAI	41
3.1.1. Talaj- és vízmintavétel.....	41
3.1.2. Minta-előkészítés és analitikai vizsgálatok a talaj- és vízminták szennyező anyagainak kimutatására.....	43
3.1.3. Biológiai teszt módszerek a mintákban előforduló szennyezések káros hatásainak meghatározásához.....	45
3.2. CRY-TOXINOK KIMUTATÁSA ÉS HATÁSVIZSGÁLATAI.....	50
3.2.1. Bt-kukoricák termesztése, növényi részek mintavétele	50
3.2.2. Kísérlet beállítása a Cry1Ab-, Cry34Ab1- és a Cry35Ab1-toxinok kimutatás- és hatásvizsgálataira	51
3.2.3. Kísérlet beállítása a Cry4-toxin kimutatás- és hatásvizsgálataira.....	53
3.2.4. Minta-előkészítés és analitikai vizsgálatok a Cry-toxinok hatásának és lebomlásának kimutatására.....	54
3.2.5. Biológiai teszt módszerek a Cry-toxinok káros hatásainak vizsgálataihoz	58
4. EREDMÉNYEK	61
4.1. IPARI ÉS MEZŐGAZDASÁGI EREDETŰ SZENNYEZÉSEK KIMUTATÁS- ÉS HATÁSVIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYEI	61
4.1.1. Az analitikai vizsgálatok eredményei	61
4.1.2. Biológiai vizsgálatok eredményei.....	63
4.2. CRY-TOXINOK KIMUTATÁS- ÉS HATÁSVIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYEI	69
4.2.1. A Cry1Ab1- illetve a Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinokkal végzett vizsgálatok eredményei.....	69
4.2.2. A Cry4-toxinnal végzett vizsgálatok eredményei.....	78

5. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	84
5.1. IPARI ÉS MEZŐGAZDASÁGI EREDETŰ SZENNYEZÉSEK KIMUTATÁS- ÉS HATÁSVIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYEI	84
5.2. CRY-TOXINOK KIMUTATÁS- ÉS HATÁSVIZSGÁLATAINAK ÉRTÉKELÉSE	91
6. ÖSSZEFOGLALÁS	97
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	102
8. IRODALOMJEGYZÉK	103
9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	118
10. NEW SCIENTIFIC RESULTS	120
FÜGGELÉK.....	122
PUBLIKÁCIÓS LISTA	122
<i>Az értekezés témakörében.....</i>	<i>122</i>
<i>Egyéb közlemények.....</i>	<i>124</i>

KIVONATOK

Magyar nyelvű kivonat

Perzisztens növényvédő szerek hatástartam- és lebomlásvizsgálatai

A doktori értekezés témája különböző növényvédő szerek és szermaradékaik előfordulásának, lebomlásának, hatástartamának és mellékhatásainak vizsgálata volt. A szerző egy országos talajmonitorozási program részeként egy kiválasztott magyarországi megye több, eltérő művelésű területéről származó víz-és talajminta analitikai (GC-MS, ELISA, ICP-AES) és biológiai toxicitási (*Daphnia magna* immobilizációs teszt) vizsgálataiban vett részt. A kapott talajminták 18%, míg a vízminták 38%-a tartalmazott növényvédő szermaradékot (leggyakoribb az *atrazine* volt), főként alacsony koncentrációkban, melyek többsége nem okozott akut mortalitást *D. magna* testállaton. A vizsgált vízminták 53%-a, míg a talajminták 18%-a tartalmazott kimutatható mennyiségű toxikus elemeket (főként B, Se, Cu, As). Néhány erősen szennyezett minta erős toxicitású volt, míg a szubletális koncentrációban jelen lévő szennyezések megváltoztatták az egyedi toxicitásokat (pl. Cu és *diazinon* között). A vizsgált vízminták 26%-a tartalmazott *glyphosate* herbicidet, melyre a *D. magna* különböző törzsei eltérő érzékenységet mutattak. *D. magna* akut és *Danio rerio* teratogenitási tesztben legtoxikusabbnak a polietoxilált faggyúamin (POEA) formázóanyag mutatkozott, ezt követte a Roundup Classic készítmény, a legkevésbé káros pedig az aktív hatóanyag, a *glyphosate* volt. Szubletális koncentrációkban a vizsgált anyagok a *D. rerio*-embriókon főként vérkeringési zavarokat, deformitásokat és a szívritmusszabályozást okoztak.

A szerző a Cry-toxinok vizsgálatához *MON 810* és *DAS 59122-7* transzgenikus kukoricavonalak és ezek közel izogenikus párjai növényi törmelékét juttatta a Dunából és a Velencei-tóból származó vizet tartalmazó akváriumokba. Analitikai módszerrel (ELISA) a vízbe kerülő toxin mennyiségét nem sikerült kimutatni. Mindkét víztípusban az első nap alatt drasztikusan lecsökkent a transzgenikus kukorica-levéltörmelék toxintartalma, majd a csökkenés lassabb ütemben folytatódott. Akut vizsgálatokban egyik típusú kukoricaváltozat sem okozott mortalitást *Daphnia magna* és *Aedes aegypti* testállatokon. Krónikus vizsgálatokban a kukoricával táplált *D. magna* anyák pusztulása szignifikánsan nagyobb volt a kezeletlen kontrollnál, a transz- és izogenikus vonalak között nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni. A legnagyobb utódszám a kezeletlen kontrollnál volt megfigyelhető, a

transz- és izogenikus kukoricaváltozatok közötti különbség statisztikailag nem volt igazolható.

A szerző – egy kutatói kollektíva részeként – a Cry4-toxin koncentrációját és hatástartamát természetes élőhelyet modellezve mérte, ehhez eredeti fejlesztésű ELISA rendszert használt, melynél a kimutatási határ a *Bti*-granulátumra és a -folyadékra 170, ill. 900 ng/ml volt. A toxin koncentrációja az eltelt napok függvényében csökkent, a DT_{50} a Velencei-tó, Hévíz és Körös vizét tartalmazó akváriumokban 3,8; 4,5 és 5,5 napnak adódott. A szúnyoglárvák mortalitási tesztjének eredményei eltérően alakultak a különböző helyekről származó akváriumi vizekben, erős függést mutatva a szervesanyag-tartalomtól.

Summary

Studies on effect duration and side-effects of persistent pesticides

Pesticide residues and contaminating elements were detected in soil and water samples taken in different agricultural and industrial fields by using analytical and toxicological tests. Mixture effects were observed among different pesticides on *Daphnia magna* and chronic effects of glyphosate on *Danio rerio* were determined. Side-effects of Cry-toxins of *Bt*-corns were investigated on *D. magna* and *Aedes aegypti*, but acute toxic effects were not detected. In chronic tests, the mortality of the adults and the number of offsprings were different from control group. To determine Cry4-toxin content in surface water, an in-house ELISA system was used. Mortality tests on *A. aegypti* were set to verify the toxic effects of toxin-containing formulations, in which the granulated form was proven to be the applicable formulation.

Zusammenfassung

Untersuchung der Persistenz und Abbaubarkeit von Pflanzenschutzmitteln

Im Rahmen dieser Doktorarbeit Pestizidreste und chemische Kontaminanten wurden in Boden- und Wasserproben von verschiedenen landwirtschaftlichen und industriellen Gebieten analysiert. Konzentration von Wirkstoffe und deren toxische Wirkungen wurden mit analytischen und toxikologischen Testverfahren festgestellt. Die Anwendung von Pestizid-Kombinationen hat einen Mischung-Effekt bei *Daphnia magna* gezeigt. Im Falle von Glyphosat chronische toxische Effekten wurden bei *Danio rerio* festgestellt. Nebenwirkungen von Cry-Toxinen wurden bei *Daphnia magna* und *Aedes aegypti* gefuttern mit *Bt*-Mais untersucht. In den chronischen Tests die Sterblichkeit der Erwachsenen und die Anzahl an Nachkommen waren signifikant unterschiedlich in den Behandelten- und in Kontrollgruppen. Um Cry4-Toxin aus Oberflächenwasser zu bestimmen, hat die Autorin ELISA-System entwickelt in eigenem Labor verwendet. Eine Sterblichkeit Test mit *A. aegypti* wurde benutzt, um die Effektivität die toxischen Chemikalien in verschiedenen Form zu testen. Es wurde festgestellt, dass das Toxin den besten Effekt in der granulierten Form aufweisen kann.

1. Bevezetés

A környezetünkbe kijuttatott kémiai anyagok egyik nagy csoportját alkotják a növényvédő szerek, melyeket évtizedek óta, világszerte a mezőgazdasági termelés során a termés védelme érdekében alkalmaznak (Palumbi, 2001), egyre nagyobb gondot jelentve ezzel a környezet kémiai terhelésére (Barceló és Hennion, 1997) és a biológiai sokféleség megőrzésére (Vitousek et al., 1997). A technológiák fejlődésével a régebben használt természetes hatóanyagokat (pl. nikotin, kén) felváltották a különböző szintetikus vegyületek. Az iparszerű, nagyüzemi mezőgazdaság, a monokultúrás termesztés a kártevők nagymértékű felszaporodásával jár együtt, így a termés megóvása fontos feladat. A folyamatosan növekvő növényvédőszer-használat hazánkban (Darvas, 2000) és világviszonylatban is a hatvanas-hetvenes években tetőzött, főként perzisztens klórozott szénhidrogének (pl. *DDT*, *dieldrin*, *campechlor*) alkalmazásával. Használatukkal a növénytermesztés biztonságosabbá vált, csökkent az egységnyi termék előállításának költsége, bár ezzel párhuzamosan számtalan nemkívánatos mellékhatás is megjelent (Darvas, 1999a). Ebben az időszakban még előnyös tulajdonságnak tekintették, ha egy anyag hosszú ideig a környezetben maradt, mert így hosszú hatásúnak mutatkozott.

Rachel Carson 1962-ben megjelent könyve, a *Néma tavasz* volt a társadalom számára az első jól érzékelhető figyelmeztetés, amely a megmaradóképes (perzisztens) vegyszerek veszélyeire felhívta a figyelmet (Carson, 1962). Idővel ezeket a hatóanyagokat felváltották az egyre specifikusabb, környezetkímélőbb hatásmódú anyagok. A felhasznált szerek mennyiségében csökkenő tendencia mutatkozott, de néhány igen perzisztens vegyület egészen az Európai Unió csatlakozást követő hatóanyag-revízióig széleskörűen alkalmazásban maradt. A klórozott szénhidrogének hazai utolsó képviselőjét, a *lindane* hatóanyagot 2008-ban vonták ki a forgalomból. (Darvas, 2000; Pethő és Griff, 2012). A nagyfokú perzisztenciával rendelkező anyagokat POP (*Persistent Organic Pollutant*)-vegyületeknek nevezzük (United Nations, 2001). Számos kémiai anyag csak meghatározott körülmények között tekinthető hosszútávon stabilnak, ezek az ún. másodrendű perzisztens vegyületek (pl. *atrazine*) (Eljarrat és Barceló, 2003).

A növényvédelem fontos és időszerű kérdése a perzisztencia jelensége. Míg korábban, a 70-es években – a hatástartam fokozására – minél stabilabb és hosszú időn át megmaradó hatóanyagokat fejlesztettek, addigra ma már – a környezetterhelés csökkentése érdekében – a perzisztens szerek visszaszorítása a cél. A környezetvédelmi szempontok előtérbe kerülése révén a gyorsabb lebomlású, összetett és specifikus hatású anyagok váltották fel a

korábbiakat. Az, hogy egy adott vegyület perzisztensnek tekinthető-e, számos tényezőtől függ, emellett a megmaradóképesség tág határok között mozog. Dolgozatomban ilyen, bizonyos környezeti feltételek mellett perzisztens anyagokat vizsgáltam és hasonlítottam össze. Ezek némelyike (pl. *atrazine*, *trifluralin*, *acetochlor*) másodrendű perzisztens növényvédőszer-hatóanyagok (REF), míg egyes, a géntechnológiai úton módosított (GM) növényekben termelődő transzgenikus toxinfelhárítók (pl. Cry1Ab) a növényi sejtekben a lebomlás ellen védelmet nyerve szintén mutatnak bizonyos perzisztens jelleget (Székács és Darvas, 2012a).

A növényvédő szerek jelenlegi engedélyezési eljárásaiban kitüntetett szerepük a toxikológiai és ökotoxikológiai hatásvizsgálatok. Munkánk során célunk volt felmérni a vizes környezetbe kijutó, növényvédelmi célokat szolgáló vegyületek hatásait és lebomlási mintázatát, különösképpen a nem célszervezetek körében. A kikerült növényvédő szerek számos esetben használatuk befejeztével is a környezetben maradnak, így azzal egyéb élő szervezetek, és végső soron az emberi társadalmak is kapcsolatba kerülhetnek (Coupe et al., 2011; Hanke et al., 2010). Ezen anyagok nem csupán akut mérgezést okozhatnak, hanem a folyamatos, alacsony koncentrációjú kitettség hatására krónikus folyamatokat indíthatnak el, emellett felerősíthetnek egyéb hatásokat is (Mann és Bidwell, 1999; Perkins et al., 2000).

Munkám során célom volt természetes környezetből származó talaj- és vízmintákban, illetve természetes élőhelyet modellező laboratóriumi kísérletben vizsgálni a növényvédő szerek hatástartamát, az akut és a krónikus expozíció hatásait mind analitikai, mind toxikológiai módszerek segítségével. Mindezek segítségével, munkánkkal megpróbáltuk felhívni a figyelmet arra, hogy egy új típusú növényvédő hatóanyag engedélyezésénél kiemelkedően fontos a széleskörű vizsgálat, túlmutatva a kötelezően előírtakon, illetve a legújabb toxikológiai és ökotoxikológiai értékelések figyelembe vétele.

2. Irodalmi áttekintés

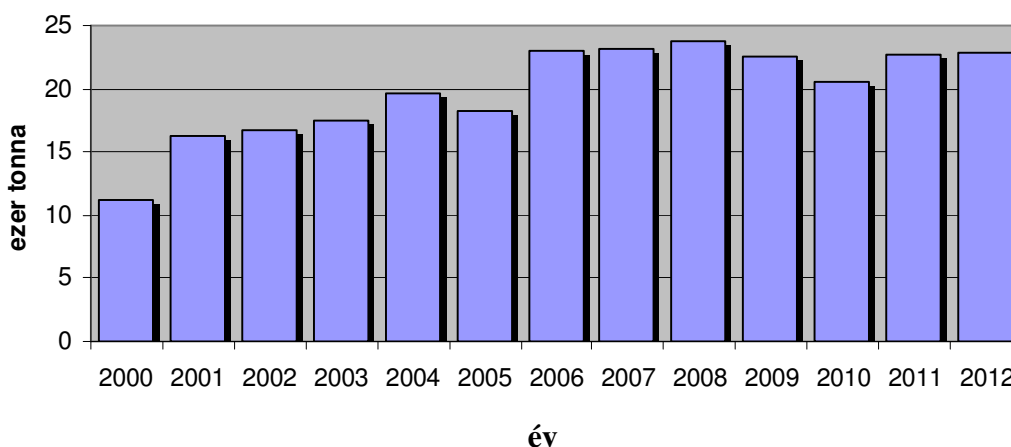
2.1. A növényvédő szerek a mezőgazdaság gyakorlatában

2.1.1. Növényvédő szerek felhasználása

A növényvédő szerek csoportosítása történhet a célszervezet vagy a kémiai szerkezet, tulajdonságok alapján. A növényvédő szerek célszervezet szerinti nagy csoportjait az állatirtó (zoocid), a gyomirtó (herbicid), illetve a gombaölő (fungicid) és egyéb mikrobaellenes vegyületek alkotják (Darvas és Székács, 2006). Az irtószerek alcsoportjait a célcsoportok nevéből a -cid raggal képezzük (pl. rovarirtó – inszekticid, szúnyogirtó – moszkiticid) (Vétek és Nagy, 2011). A zoocid szerek nagy része idegméreg, az állatok idegrendszerének működését befolyásolja, de vannak hormonális hatású, fejlődést gátló és toxin(oka)t tartalmazó szerek is. A gyomirtó hatású herbicidek közé szintén számos, eltérő kémiai szerkezetű hatóanyag sorolható, általános sejtmérgek (ásványi olajak), hormonhatású vagy a fotoszintetikus rendszer működését gátló anyagok, csírázásgátlók, illetve makromolekulák bioszintéziseinek gátlói. A fungicidek a gombák okozta betegségek elleni védelmet biztosítják. Ebben a felhasználási csoportban is megtalálhatóak az általános sejtmérgek (főként réz- és kénvegyületek), sejtlégzés-, növekedés- és különböző makromolekula-bioszintézis gátlók. Megkülönböztethetünk biológiai vagy kémiai eredetű szereket, előbbieket természetes forrásúak (pl. mikroorganizmus, növény által termelt vegyületek), utóbbiakra szintetikus előállítás jellemző (pl. szerves foszforsav-észterek, karbamátok, klórozott szénhidrogének) (Székács, 2006).

Az elmúlt fél évszázad alatt az alkalmazott inszekticid hatóanyagok 95%-a kémiai, alig 5%-a pedig biológiai ágens volt (parazitoidok, ragadozók, rovarokat megbetegítő mikrobiális eredetű anyagok). A kémiai hatóanyagok döntő többsége szintetikus eredetű volt, melynek 60%-át az idegmérgek (klórozott szénhidrogének, szerves foszforsav-észterek, zoocid karbamátok, piretroidok és neonikotinoidok), 33%-át egyéb szintetikus vegyületek, 7%-át pedig IDRD (*Insect Development and Reproduction Disrupters*, rovar-egyedfejlődést és -szaporodást zavaró hatású) anyagok tették ki. Míg az engedélyezett vegyületek száma 2001-ig emelkedő tendenciát mutatott – ami a hazai hatóanyag-revízió elmaradására vezethető vissza –, addig ezt követően jelentős csökkenés tapasztalható. 2013-ban – az Európai Unió által több lépcsőben megvalósított hatóanyag-revízió miatt – már csak 71 hatóanyag használata megengedett, s e tekintetben is a környezetbarát védekezési módok előretörését várhatjuk. Az EU növényvédőszer-revíziója igen jelentős mértékben csökkentette a szerves foszforsav-észterek, zoocid karbamátok, akaricidek és egyéb szintetikus vegyületek körét

(Darvas et al., 2013). A 2000-es évek magyarországi növényvédőszer-értékesítés alakulását szemlélteti az 1. ábra.



1. ábra. A növényvédőszer-értékesítés alakulása Magyarországon 2000 és 2012 között (Boldog, 2013)

A 2013-as feldolgozott magyarországi adatok alapján a 2012-es gazdálkodási évben a kezelt területek legnagyobb hányadán gyomirtó szert alkalmaztak. Az értékesített növényvédő szerek mennyisége 22994 tonna (8779 tonna hatóanyag) volt, amelynek legnagyobb részét (42%-át) a gyomirtó szerek tették ki, 20%-a rovarölő szer, 19%-a gombaölő szer, a maradék 18% pedig az egyéb szerek közé tartozott. A legalább egyszer növényvédő szerrel kezelt mezőgazdasági terület nagysága közel 3 millió hektár volt (Boldog, 2013). A hazai fajlagos növényvédőszer-felhasználás európai szinten átlagosnak mondható. Ma Magyarországon a növényvédőszer-piacot hat nagyvállalat (Bayer, BASF, Dow AgroSciences, DuPont, Monsanto, Syngenta) uralja, együtt az országos forgalom mintegy 80%-át lefedik (Vágó, 2013).

A növényvédő szerek Európai Unió szabályozása 2009-ben az 1107/2009/EK rendelet elfogadása révén egységesített rendszer létrehozásának irányába mozdult el. Ez, illetve a szermaradék-határértékeket szabályozó 396/2005/EK rendelet, a 91/414/EGK tanácsi irányelv módosítása és a peszticidek fenntartható használatáról szóló 2009/128/EK irányelv a növényvédő szerek szabályozásának új európai keretét biztosítják (Németh és Székács, 2012).

A vegyi anyagok jelenlegi szabályozásának egyik anomáliája a peszticid és biocid kategóriák egymástól eltérő gyakorlati besorolásából és jogi megítéléséből ered. Egyazon hatóanyag ugyanis más megítélésben részesül és más jogi besorolás alá esik, amennyiben biocidként (közegészségügyi alkalmazás) és másba, ha növényvédő szerként alkalmazzák,

miközben mind kémiai, mind ökotoxikológiai tulajdonságai alkalmazástól függetlenül értelemszerűen azonosak maradnak. Ezen túlmenően még állatgyógyászati felhasználású szerek között több akaricid is feltalálható. Ilyen többes megítélésű hatóanyagok a mára visszavont *malathion* vagy a jelenleg is alkalmazható *deltamethrin*, de ide tartoznak a mikrobiális eredetű és rokon lektinfehérjék, a Cry-toxinok is. Környezetanalitikai és ökotoxikológiai szempontból irreleváns, hogy adott hatóanyagot állatgyógyászati, növényvédelmi vagy közegészségügyi célzattal juttatnak ki, a fontos tényező az, hogy – adott kijuttatási forma mellett – meddig marad fenn a környezetben, illetve milyen mértékű expozíciót és ezen keresztül (öko)toxikus hatást teremt.

2.1.2. Növényvédő szerek használatának környezeti aggályai

Az Európai Környezetvédelmi Ügynökség (EEA – European Environment Agency) megállapítása szerint az EU országain belül potenciálisan környezetetszennyező tevékenység több mint 3 millió helyszínen zajlik, e területek 8%-a szennyezett és remediációra szorul. Az előrevetítések alapján ez az arány 2025-re akár 50% is lehet. Leggyakoribb szennyezőként nehézfémeket, ásványi olajakat, policiklusos aromás szénhidrogéneket, fenolokat, klórozott szénhidrogéneket és egyéb növényvédő szereket azonosítottak Európában (Rodrigues et al., 2009). Vízszennyezők esetében főként különböző szénhidrogének, szerves anionok, nehézfémek, ill. növényvédő szerek tűnnek fel. Talajok esetében a mezőgazdasági tevékenységből eredő szennyezések a leggyakoribbak, melynek következtében szikesedés, termőképesség elvesztése és elsivatagosodás léphet fel (Lal, 1990). A nem megfelelő kijuttatás során a növényvédő szerek a célszervezeteken kívül károsíthatják a terület természetes élővilágát is (Rohr és Crumrine, 2005).

A növényvédő szerek potenciális veszélyt jelenthetnek az élő szervezetekre. Még a legszigorúbb kezelési előírások betartása mellett is megvan az esélye, hogy a kijuttatott készítmény nem, vagy nem csak a célterületre jut el. A kijuttatáskor előforduló elsodródáson kívül erre többféle útvonalon (elpárolgás, lemosódás, lefolyás, kimosódás stb.), különböző természeti jelenségek (szél, víz, élőlények stb.) által, kémiai reakciók (oxidáció, redukció, konjugáció, hidrolízis stb.) útján van lehetőség. A vegyületek sorsát ezen kívül még számos egyéb paraméter befolyásolhatja (pl. vízzoldhatóság, pH, a talaj oxigénellátottsága és mikrobiális aktivitása, perzisztencia stb.). Útjuk során hígulhatnak, feldúsulhatnak, kötődhetnek a talajásványokhoz, a lebomlás során pedig különböző – akár toxikus – metabolitok is keletkezhetnek. Egy vegyület sorsát kémiai tulajdonságai és a környezeti

feltételek együttesen szabják meg (Seiber, 2002). A vegyületek környezeti sorsának megjósolására számos módszer létezik (pl. fizikai, matematikai modellek), melyek a lehető legtöbb paramétert próbálják figyelembe venni (Jetten et al., 1999; Borah és Bera, 2003).

A legfontosabb mérőszámok a vízdoldhatóság, K_{ow} (oktanol-víz megoszlási koefficiens), a felezési idő (DT_{50} – az az idő, amely a vegyület 50%-ának lebomlásához szükséges a talajban) és a K_{oc} (szerves szén-víz megoszlási koefficiens – a vegyület szerves anyaghoz való kötését jellemzi), melyek alapján egy adott hatóanyag környezeti sorsa jellemezhető (FAO, 2003).

Az élő szervezetek által felvett vegyületek sorsa is igen változatos. Leggyakrabban valamely detoxifikációs enzimrendszer segítségével a szervezet kiválasztja, mint metabolitot. Amennyiben vízdoldható vegyületről van szó, a termék ürítésre kerül. A lipofil anyagok képesek bioakkumulációra, azaz feldúsulni és raktározódni valamely szövetben. Ebben általában a lipidgazdag szövetek érintettek (pl. csontvelő, ivarszervek, zsírszövet, emlő stb.). Ha a feldúsulás tápláléklánc mentén következik be, biomagnifikációról beszélünk. Ebben az esetben nagyságrendbeli növekedés tapasztalható a vegyület koncentrációjában. Egy vegyület egészségügyi kockázatának jellemzéséhez a legfontosabb paraméterek a koncentráció/dózis és a kitettség. Az ivóvizet szennyező anyagok veszélyessége nagyrészt abban rejlik, hogy krónikus kitettséget hoznak létre (Darvas, 2006a).

Az élő szervezeteket károsító anyagokat toxikus hatásuk alapján különböző csoportokba sorolhatjuk. Az akut hatásokon túl számos szennyező hosszútávú, krónikus toxikus hatással rendelkezik. Ide soroljuk az örökítőanyag-károsítókat (mutagének), rendellenes fejlődést okozókat (teratogének), rákkeltőket (karcinogének) és a hormonrendszer károsítóit (hormonmodulánsok) (Darvas et al., 2009a).

A hatóanyagokat nem elegendő azonban önmagukban vizsgálni, mivel az élőlények gyakran egyszerre több vegyi anyag hatásának vannak kitéve. Különböző kölcsönhatások révén hatásuk összeadódhat (addíció), felerősödhet (szinergizmus), de előfordulnak gátló hatások is (antagonizmus). Számos taxon esetében – zooplanktonok, algák – egyes inszekticidek (*carbaryl*, *malathion*, *chlorpyrifos*, *diazinon*, *endosulfan*) keverékének együttes hatása nem tér el jelentősen az egyenkénti alkalmazás okozta toxicitástól, vagyis a hatások alapvizsgálatok eredményei alapján becsülhetőek. Ugyanezen rovarölőket kételtűeken alkalmazva ugyanakkor szinergista hatás mérhető. Hasonló jelenséget figyeltek meg herbicidek (*acetochlor*, *metolachlor*, *glyphosate*, *2,4-D*, *atrazine*) keverékének vizsgálata során is (Relyea, 2009). Emellett, a szubletális koncentrációban jelenlévő szennyező vegyületek egyéb stresszfaktorok hatását is felerősíthetik (pl. ragadozóstressz, kompetíció,

abiotikus tényezők) (Jones et al., 2010; Janssen és Stoks, 2013). A vízi életközösségekbe bekerülő szennyező anyagok az egyéni toxicitáson túl a közösségek szerkezetére is hatással vannak (Relyea és Hoverman, 2006).

Három olyan nemzetközi szervezet ismert, melyek mértékadóak a kémiai anyagok krónikus veszélyességének megítélésében és besorolásában: az IARC (*WHO* Nemzetközi Rákkutató Ügynöksége – *International Agency for Research on Cancer*), az US EPA (az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala – *United States Environmental Protection Agency*), illetve az Európai Unió CMR (*Carcinogenic/ Mutagenic/ Toxic to reproduction*) listája, melyen a karcinogén, mutagén és reprotoxikus vegyi anyagok szerepelnek.

2.1.3. Víz- és talajszennyező növényvédő szerek

Az agrártevékenységből származó szennyezések vizes lefolyások által közvetlenül vagy közvetve bekerülhetnek természetes vízgyűjtőkbe, ahol állandó szennyezési forrást táplálnak. A felszín alatti vizek védelme az ivóvíz tisztaságának szempontjából kiemelkedő feladat. A környezeti hatások figyelembevétele okán már a 90-es évek közepén megállapították, hogy a növényvédőszer-használatot a lehető legkisebb mértékre kell csökkenteni (McLaughlin és Mineau, 1995). Számos olyan szer maradéka található meg vizes környezetben, amely nem engedélyezett vizes élőhelyen történő felhasználásra, tehát szennyezés útján került oda (Thompson et al., 2004).

A felszíni vizeket főként diffúz (nagy kiterjedésű, kis koncentrációjú) szennyezés formájában veszélyeztetik a mezőgazdasági termelés során alkalmazott növényvédő szerek. A felszíni vizek növényvédőszer-tartalma az egyik legjobb indikátor a nem pontszerű szennyezések észlelésére, ezért fontos ezek rendszeres ellenőrzése. A szennyezések mérséklését alapvetően a területhasználat, a gazdálkodási gyakorlat, valamint az erózió szabályozásán keresztül lehet véghezvinni (Kovács és Clement, 2008). Az elszórtan alkalmazott szennyvízöntözés szintén számos környezeti problémát vet fel, mivel a növények a szennyvízben található szerves vegyületeket képesek felvenni és akkumulálni, így a táplálékláncba juttatni, valamint az öntözés hatására ezek az anyagok mobilissá válva egyéb helyekre is eljuthatnak, perzisztenciájuk és biológiai hozzáférhetőségük is megváltozhat (Müller et al., 2007).

A hazai növényvédelmi hálózat 1994 és 2000 között kétezer felszíni vízmintát vizsgált meg vízszennyező hatóanyagra vonatkozóan. A leggyakoribb felszíni vízszennyezőnek az

atrazine (>100 ppb) bizonyult, amit a minták 6%-ából mutattak ki. A minták 4%-a tartalmazott egy másik kukorica-gyomirtót, az *acetochlort*, 3%-a pedig *HCH* és *diazinon* rovarirtókat (Károly et al., 2001).

Az *atrazine*- mely a triazin herbicidek közé sorolható hatóanyag - aerob körülmények között, a talaj felső rétegében közepes gyorsasággal bomlik, azonban bemosódás után a mélyebb rétegekben, oxigén hiányában, valamint a talajvízben perzisztens módon viselkedik. Az *atrazine* esetében ecetmuslicán (*Drosophila melanogaster*) végzett tesztek többek között aneuploiditást (Murnik és Nash, 1977) és szomatikus mutációkat, rekombinációs zavarokat (Tripathy et al., 1993) mutattak ki. Humán limfocitán *in vitro* kísérletben az *atrazine* kromoszómarendellenességet okozott (Meisner et al., 1992). Már kis koncentrációban (100 pg/ml) is hormonmoduláns hatású kételtűekre, a hím békák hermafrodita fejlődését képes kiváltani (Colborn et al., 1996). Hayes és munkatársai afrikai karmosbékákkal (*Xenopus laevis*) végzett kísérletei is ezt támasztották alá (Hayes et al., 2002; Hayes et al., 2003). Egy 2008-ban született felülvizsgálatban 95 *atrazine*-nal foglalkozó tanulmányt vetettek össze, mely alapján a környezetben megtalálható koncentrációban az *atrazine* reprodukcióra és ivari fejlődésmentre kifejtett negatív hatását a halak, kételtűek és hüllők esetében viszont nem találták bizonyítottnak (Solomon et al., 2008). Rohr és McCoy 2010-es metaanalízisében édesvízi halakkal és kételtűekkel kapcsolatos vizsgálatok elemzése után az *atrazine*-nak metamorfózis közbeni méretcsökkentő hatást, immungyengítést, spermatogenezis gátlást tulajdonít (Rohr és McCoy, 2010).

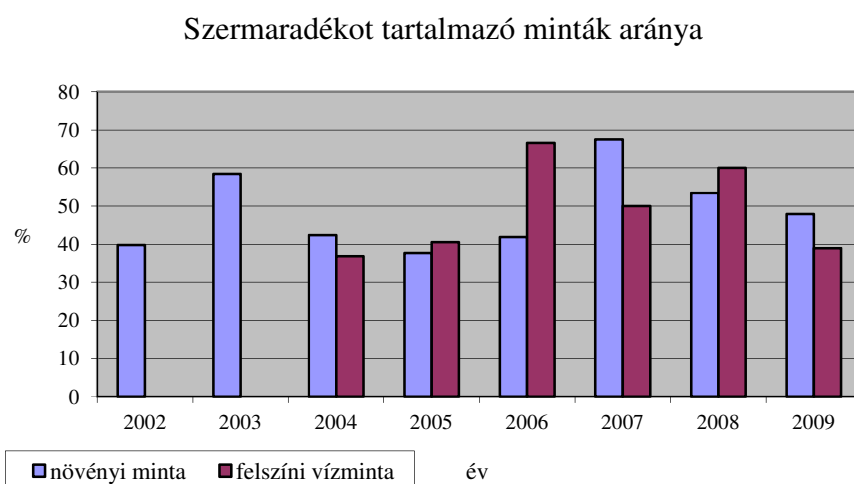
2000 és 2004 között Magyarországon különböző eredetű felszíni vizekből (csapvíz, Duna víz, egyéb tavak és folyók) származó hatszáz felszínivíz minta 60%-a tartalmazott detektálható mennyiségű szermaradékot (Maloschik et al., 2007). Ezen vizsgálatban is kiemelhető volt három hatóanyag, a *diazinon*, az *atrazine* és az *acetochlor*.

Az *acetochlor* (klór-acetamid gyomirtószer) hatóanyag *in vitro* tesztekben (pl., Ashby et al., 1996) genotoxikusnak bizonyult, viszont az *in vivo* tesztek eredményei nem utaltak egyértelműen mutagén potenciálra. Hosszútávú vizsgálatokban különböző típusú daganatok előfordulásának gyakoriságát növelte. Ökotoxikológiai vizsgálatokban nagyon toxikusnak bizonyult vízi élő szervezetekre (NOAEL értéke 0,2 µg/l) (EFSA, 2011). A *metolachlor* mutagén és citotoxikus hatást *in vitro* és *in vivo* tesztekben nem mutatott, de patkányvizsgálatokon alapuló eredmények alapján lehetséges humán karcinogén anyagnak minősítették (US EPA, 2003). Ökotoxikológiai tesztekben főként kételtűeken mutatott toxikus hatásokat (Osano et al., 2002; Mazanti et al., 2003). A szerves foszforsav-észter

diazinon rovarrevő madarakon akut és krónikus toxicitást okozhat, emellett erősen toxikus vízi élő szervezetekre (European Commission, 2006).

Ezt követően 2006 és 2008 között főként ökológiai művelésű területek víznyerő helyein a minták 25-80%-ában volt kimutatható *diazinon*-szennyezettség (<50 ppb). A minták közel fele *atrazine* (<250 ppb) és *trifluralin* (<50 ppb) hatóanyagokat tartalmazott. A *trifluralinnal* végzett korai teszteknel kromoszómarendellenesség mutatkozott humán csontvelősejtekben *in vivo* kísérletben (Nehéz et al., 1979), *D. melanogaster*-tesztben pedig aneuploiditás lépett fel (Murnik, 1978). Az Európai Bizottság 2010-ben kelt jelentésében e hatóanyagnak vízi szervezetekre (főként halakra) kiemelkedően toxikus tulajdonságát tartotta kellően megalapozottnak (European Commission, 2010).

A szermaradék-monitoring program elérhető éves jelentései a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) publikus honlapján 2002-2009 közötti időszakra vonatkozóan találhatóak meg (<http://www.nebih.gov.hu>).



2. ábra. A vizsgált minták között szermaradékot tartalmazók aránya (%) 2002-2009 között

További fontos vízszennyező hatóanyag a *glyphosate*, mely esetben a hatóanyag és bomlástermékének szermaradékként való kimutatása nehézkes (Stalikas és Konidari, 2001; Székács és Darvas, 2012b). A kémiai analízist nehezíti a kiemelkedő vízoldhatóság, a rossz detektálhatóság és a természetes körülmények között bekövetkező gyors lebomlás. A meghatározásukra ezért általában egyedi módszert alkalmaznak, amely gyakran származékképzést is magában foglal. A kombinált megengedett szermaradékszint (MLR – *maximum residue level*) *glyphosate*-ra és metabolitjaira (pl. *AMPA* – amino-metil-foszfonsav)

ivóvízben 0,1 ng/ml az Európai Unió területén (European Council, 1998). További problémát jelent, hogy a vízben gyorsan mozgó hatóanyag és bomlásterméke a talaj szerves- és ásványi anyag tartalmához erősen kötődik (fémionokkal komplexet képezhet), így a talaj mátrixában relatív immobilissá válik (Moorman és Keller, 1996; Giesy et al., 2000). Ennek ellenére a talaj repedésein keresztül történő lefolyás és a csapadékkal való lemosódás segítségével könnyen bejuthat a felszíni és talajvízbe, ezáltal veszélyeztetve az ivóvízbázist (Coupe et al., 2011; Hanke et al., 2010). Magyarországon a környezeti állapotfelmérő vizsgálatokból általában kimaradt ez a hatóanyag, azonban más országokban rendszeres előfordulást detektáltak. Ezek a monitorozások főként kis mennyiségben, de nagy gyakoriságban mutattak ki *glyphosate*-ot és *AMPA*-t (Ludvigsen és Lode 2001; Battaglin et al., 2005; Struger et al., 2008). Az elsőgenerációs transzgenikus növények egyik típusa, a *glyphosate*-tűrő növények (pl. Roundup Ready[®] szója, kukorica) megjelenésével a herbicid preemergens használata mellett a posztemergens használatát is engedélyezték, amely tovább fokozza a környezeti terhelést (Székács és Darvas, 2012b). A *glyphosate* hatóanyag, illetve a forgalomban lévő készítmények mellékhatásairól jelentős szakmai vita folyik, számos terhelő eredménnyel. Az utóbbi években több kutatásban toxikus (Mann és Bidwell 1999; Relyea 2005; Relyea és Jones 2009; Jones et al., 2010; Lajmanovich et al., 2010) és teratogéngyanús hatásúnak (Perkins et al., 2000; Lajmanovich et al., 2005; Paganelli et al., 2010; Jayawardene et al., 2010) mutatkozott kétélűeken és madarakon. Emellett csökkent a bizonyos növények betegségekkel szembeni ellenálló képességét, miközben segíti pl. a *Fusarium* fajok gyökereken történő kolonizációját (Johal és Huber, 2009; Zobiolo et al., 2011).

A fentebb említett hatóanyagok nagy része az utóbbi években kivonásra került az Európai Unióban (2002: *metolachlor*, 2004: *atrazine*, *HCH*, 2007: *diazinon*, 2010: *trifluralin*, 2012: *acetochlor*), ugyanakkor a *glyphosate* 2015-ig, az *S-metolachlor* pedig 2017-ig engedélyezett hatóanyagnak számít az Európai Unióban (*EU Pesticides Database*). A Magyarországon is érvényes EU Irányelv a felszín alatti vizekre a maximálisan megengedhető határértéket egyes növényvédő szerekre 0,1 ng/ml, az összes növényvédőszer-maradékokra pedig 0,5 ng/ml koncentrációban határozza meg (European Parliament and Council, 2006).

A növényvédő szerek jellemzésekor fontos megjegyezni, hogy a hatóanyagokat nem önmagukban, hanem készítményként különböző segédanyagokkal keverve hozzák forgalomba. A növényvédő szerek formázásához használt adjuvánsok között sokféle vegyületet találunk, fő típusaik az oldódás- és megtapadás-fokozók. A növényvédőszer-formázó felületaktív anyagok közvetlen diszperzió vagy szennyvíz útján jutnak a környezetbe (Székács és Darvas, 2012b). Ezeknek inaktív összetevőknek kellene lenniük, mégis gyakran

fejtenek ki a hatóanyagokra nézve szinergens hatást. A toxikológia ezeket a kombinációs hatásokat kevésbé tárta fel. Míg készítményeknél az aktív hatóanyagra való információk jól követhetők, addig a készítmények formázószereit gyártói szabadalmak védik. Ezekben közös, hogy az erre a célra felhasznált anyagokat károsító hatás nélkülinek tekintik (Székács és Darvas, 2012b). A felületaktív anyagok szabadföldi alkalmazása után bekövetkező környezeti sorsáról kevés adat áll rendelkezésre, bár számos kedvezőtlen hatásukra derült fény. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (EPA) a biológiailag inert felületaktív anyagot (POEA – polietoxilált faggyúamin) halakon toxikusabbnak osztályozta a vele alkalmazott aktív hatóanyagnál (*glyphosate*) (Székács és Darvas, 2012b). A POEA megváltoztatja a sejtmembrán áteresztőképességét, így erősítheti a biológiailag aktív anyagok apoptózisra és - nekrozisra gyakorolt hatását. Számos felületaktív anyag befolyásolhatja a gerincesek egészségi állapotát, embrionális fejlődését és hormonegyensúlyát, főként vízi élőhelyeken (Benachour és Séralini, 2009; Paganelli et al., 2010). Guilherme és munkatársai különböző Roundup készítményeket vizsgáltak, az európai angolna (*Anguilla anguilla*) vérésejtjein DNS-károsítónak találták azokat (Guilherme et al., 2012). A toxikológiai kutatásokban az egyedi toxicitás általában jól kézben tartott, azonban a kombinációk hatásainak vizsgálata komoly nehézséget jelent, hiszen sok esetben az antagonizáló, az additív és a szinergizáló hatások nagyon is más toxikológiai profilt eredményeznek (Székács és Darvas, 2012b).

A növényvédő szerek engedélyezési folyamatában a nem célszervezetek esetében kockázatbecslést kell végezni. Vízi szervezetek esetében a 44/2000 EüM rendelet előírásait alkalmazza a hatóság. Azon növényvédő szerekre nézve, amelyek nem tartoznak a növényvédő szerek forgalomba hozatalának engedélyezésére vonatkozó rendelet (89/2004. (V. 15.) FVM rendelet) hatálya alá, toxicitáson, azaz a növényvédő szerek veszélyességén alapuló besorolást kell alkalmazni, a legérzékenyebb tesztelt vízi szervezet alapján. A vízi élőlények védelme érdekében minden esetben a víz körül pufferzónát kell kijelölni, melyen belül nem történhet kezelés. A pufferzóna kijelölése kockázatbecslés vagy ennek hiányában veszélyességi besorolás alapján történhet.

A talajok típusa, vízellátottsága, fizikai szerkezete és kémiai összetétele (pl. anion- és kationtartalma, pH) valamint mikrobiális aktivitása nagyban befolyásolja a bekerülő növényvédőszer-hatóanyagok további sorsát. Némely hatóanyag (pl. triazinok, karbamátok) a talaj szervesanyag-tartalmához kötődnek, mások viszont csak bizonyos összetételű részecskéken adszorbeálódnak. A vegyületek talajon belüli mobilitását jellemzi a talajadszorpciós állandó (K_d), amely a hatóanyag megoszlási hányadosa a vizes fázis és a

talajrészecskék között. A permetezőszerek kijuttatásakor a készítmény nagy része a növény helyett közvetlenül a talajfelszínre kerül. A talajra kerülő hatóanyag UV-sugárzás hatására elbomolhat, kötődhet a talajkolloidokhoz (pl. 2,4-D), illetve a vízzoldható vegyületek a talaj mélyebb rétegeibe mosódhatnak. Az 1968-ban – a világon elsőként Magyarországon – betiltott rovarölő szernek, a DDT-nek máig mérhető nyomai találhatók talajainkban. A 90-es években a megyei növényvédelmi hálózat nagy mennyiségű mintát vizsgált meg, és azt találták, hogy hazai talajainkban a DDT és bomlásterméke, a DDE maradékainak előfordulása a leggyakoribb. A talajok 20-30%-ából volt kimutatható atrazine (<100 ppb), 10-20%-ából pedig 2,4-D (200-600 ppb). 1999 és 2002 között szántóterületeken végzett vizsgálatok alapján a talajminták 8-25%-ában fordult elő atrazine, 10-40%-ban 30 ng/g alatti koncentrációban pedig trifluralin gyomirtó hatóanyag (Oldal et al., 2006). Téli mintavételezés során kimutatott atrazine-szennyezés a hatóanyag ún. másodrendű POP- (Persistent Organic Pollutant – megmaradóképes szerves szennyező) vegyület jellegét igazolja, mivel 8-9 hónappal a kijuttatás után is detektálható volt a talajban (Le et al., 1996). 2005 és 2008 között főként ökológiai művelésű területek vizsgálva lényegesen kisebb szennyezettséget detektáltak. Azonban még itt is, a mért 250 minta mintegy 20-30%-ából volt kimutatható a DDE (<100 ppb). Hasonló koncentrációban mutatkozott a minták 5-15%-ában a 2000-ben kivont lindane (Székács et al, 2008). A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal nyilvános jelentéseiben a növényi- és felszíni vízminták mellett igen kevés esetben tesznek említést talajminták vizsgálatáról, emiatt a szermaradékok megjelenésének éves alakulásáról nincsenek információk (<http://www.nebih.gov.hu>).

2.1.4. Szennyezések kimutatására alkalmazott analitikai eljárások

A talajmonitoring célja a talajtulajdonságok térbeni eloszlásának és időbeni változásainak feltárása. Hazánkban 1992 óta üzemel a Talajvédelmi Információs és Monitoring Rendszer (TIM), amely a tervezett országos Környezetvédelmi Információs és Monitoring Rendszer (KIM) egyik első működő alrendszereként jött létre (Marth és Karkalik, 2004). A TIM fenntartása és üzemeltetése kizárólagosan állami feladat, működése kiterjed az ország egész területére, művelési ágak, tulajdonjog és egyéb szempontok szerinti korlátozások nélkül. Feladatkörébe tartoznak a helyszíni feltárások és az évenkénti mintavétel, a talaj- és talajvízminták laboratóriumi vizsgálata, a speciális növényvédőszermaradék-vizsgálatok, illetve a mikrobiológiai vizsgálatok. A TIM célja az ország talajkészleteinek minőségében bekövetkező változások regisztrálása és a talajállapot változásainak időbeni nyomonkövetése

a megfelelő szabályozás érdekében. A monitorozás során növényvédő szereket és bizonyos bomlástermékeiket vizekben és talajokban vizsgálják, műszeres analitikai eljárással. A vizsgálandó paraméterek egy részét csak egyszer, az első évben határozták meg. Az egyes talajtulajdonságok időbeli változékonyságától függően több vizsgálatot azonban 1, 3 vagy 6 évente megismételnek. A korábbi tapasztalatokra támaszkodva a növényvédőszer-hatóanyagok analitikai, toxikológiai és felhasználási megfontolások alapján megválasztott körét vizsgálják, különböző extrakciós minta-előkészítési eljárások, majd azt követő tömegspektrometriás (GC-MS, HPLC-MS) analitikai módszerek segítségével (Marth és Karkalik, 2004).

A növényvédőszer-hatóanyagok meghatározása víz- és talajmintákból a környezetanalitika feladata. Az analitikai módszer függ a minta fizikai és kémiai tulajdonságaitól és a vizsgálni kívánt vegyület paramétereitől. A gyakran használatos módszerek közé tartoznak a kromatográfiás (pl. gáz-, folyadék-), spektroszkópiás (pl. atomabszorpciós-, és atomemissziós-, tömeg-) és immunanalitikai (pl. ELISA) eljárások.

Növényvédő szerek meghatározásához jól alkalmazható a gázkromatográfhoz (GC) kapcsolt tömegspektrométer (MS) módszer (Barceló és Hennion, 1997; Kreuger, 1998). A tömegspektrometriás detektálás előnye az alacsony kimutatási határok mellett, hogy a vegyületről szerkezeti információ is nyerhető. A GC-MS vizsgálatokban talált vegyületeket részint analitikai standardok, részint GC-MS spektrumkönyvtárak (NIST 98, WILEY 7th Ed.) segítségével azonosítják (Maloschik et al., 2007). A minta-előkészítés során a környezeti mintát megfelelő, mérhető állapotba kell hozni, ami a minta víz-, olaj-, szénhidrát- és fehérjetartalmától függően különböző módszereket igényel (pl. homogenizálás, dúsítás, hígítás, zavaró komponensek eltávolítása). Fontos lépés lehet az extrakció, a célhatóanyag kivonása bizonyos eljárásokkal (Majzik-Solymos et al., 2001). Bizonyos esetekben származékképzés lehet szükséges, azaz a célvegyületek kémiai módosítása, melynek hatására a kromatográfiás jelalak, a detektálhatóság javulhat. A GC módszerekben leginkább az illékonyság növelése (H-hidak megszüntetése) és a termikus stabilitás növelése a cél. A GC működésének alapelve, hogy a minta fűtött injektorban elpárolog, majd az oszlopra (pl. kapilláris) kerül. A minta komponenseit a vivőgáz által létrehozott kényszeráramlás hajtja végig az oszlopon, ahol azok eltérő erősségű kölcsönhatásba kerülnek vele. Az álló fázishoz erősebben kötődő vegyületek lassabban, míg a gyengébben kötődőek gyorsabban haladnak és főként a gázfázisban tartózkodnak. Az oszlopról az egymás után távozó komponenseket detektáljuk, az idő függvényében rögzített analitikai jel a kromatogram. A retenciós idő a minta komponenseinek minőségi azonosítására, míg a csúcsterület a minta komponenseinek

mennyiségi meghatározására szolgál. Fontos analitikai jellemző a kimutatási határ (LOD – *limit of detection*), ami az a koncentráció, melynél a jel/zaj-viszony 3. A célvegyületek mennyiségi meghatározását azonban csak a 10 feletti jel/zaj-viszony mellett (LOQ – *limit of quantitation*) lehet megbízhatóan végezni (Liška és Slobodník, 1996; Ma et al., 2003). A foszforsav és aminosav típusú herbicidek kimutatásában alternatívaként megjelent a nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC – *high pressure liquid chromatography*), mely az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb népszerűségnek örvend nagy szelektivitása és sokrétű alkalmazhatósága miatt. A folyadékkromatográfias módszerekben az elválasztás a különböző álló fázisokon (töltetek) átáramló folyadék halmazállapotú mozgó fázis (eluens) segítségével történik. A folyadék áramlását HPLC esetében nagynyomású pumpák biztosítják. A mozgó fázissal az oszlopba kerülő minta összetevői az álló fázison optimális esetben szétválnak, az oszlop végén eltérő időben jelennek meg, és különböző tulajdonságaik (pl. optikai elnyelés, törésmutató, vezetőképesség) alapján detektálhatók. Napjainkra a folyadékkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrometria is rutin módszerré vált. Nagy szelektivitása miatt a HPLC-MS/MS a mai nagyműszeres analitika egyik legnépszerűbb és egyre szélesebb körben elterjedt technikája, a nyomnyi mennyiségek komplex mátrixokban történő meghatározásában az első számú módszerré lépett elő az utóbbi évtizedben (Kremmer és Torkos, 2010).

Az immunkémiai módszerek egyik legismertebb képviselője az *immunoassay*, melynek számos eltérő változata ismert. A legelterjedtebb, peszticiddetektáláshoz használt eljárás az enzimjelzéses *immunoassay*, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Az ELISA rendszerek mérési alapelve az, hogy a mérendő anyaggal (célvegyülettel) szemben állati szervezetből nyert antitestet alkalmaznak a célvegyület szelektív felismerésére (Morozova et al., 2005). Ismert indirekt és direkt versengő ELISA eljárás, valamint az ún. „szendvics” ELISA módszer is. Ez utóbbi során a mérendő anyagra specifikus antitestet fizikai adszorpcióval szilárd fázison (96-lyukú mikrotiter lemez lyukainak falán) rögzítik (érzékenyítés), erre viszik rá a mérendő anyagot (standard vagy mintaoldat formájában), amit az antitest szelektíven megköt. Ezután célszerűen megválasztott jelzőenzimmel jelzett antitestet kötnek a lemezen megkötött mérendő komponenshez. A megkötődött enzim mennyiségét szubsztrát és kromofór hozzáadásával spektrofotometriás eljárással mérik. A módszerre optimált mérési koncentrációtartományban a mért jel (fényelnyelés) arányos a mérendő anyag mintabeli koncentrációjával (Davies, 2005). Versengő és szendvics ELISA módszerrel a *glyphosate* és a Cry-toxinok jelenlétét detektáltuk.

2.1.5. Szennyezések káros hatásának kimutatására alkalmazott toxikológiai eljárások

A növényvédő szerek veszélyességének megítéléséhez a hatóanyagok engedélyezési eljárásaiban toxicitási tesztek végeznek. Az idegen anyagnak való kitettség időtartama és gyakorisága alapján két típust különböztetünk meg: az akut (heveny) és a krónikus (idült) toxicitást. Előbbi típus a mérgező anyaggal szembeni egyszeri, utóbbi pedig huzamosabb ideig, főként szubletális koncentrációban jelen lévő szennyezésnek való expozíció mellett lép fel. A toxicitás kifejezésére az egyik leggyakrabban használt mérőszámok az LC_{50}/LD_{50} - vagy $LC_{50}/LD_{50}/EC_{50}/ED_{50}$ -érték (*lethal concentration/dose, effective concentration/dose*). Ez alatt az adott vegyület azon – letális vagy effektív – koncentrációját/dózisát értjük, amely a vizsgált tesztállatoknál 50% mortalitást vagy hatáskifejtést eredményez. Minél kisebb ez az érték, annál mérgezőbb a hatóanyag az adott tesztorganizmokra (Hamilton et al., 1977; Várnagy, 1995). Az LD_{50} -, LC_{50} -, EC_{50} - és ED_{50} értékeket legalább öt különböző – 1-99% mortalitást okozó – koncentráció/dózis alapján számíthatjuk ki. Ha a mortalitás és az alkalmazott dózisok között az összefüggés lineáris, erre probitanalízist alkalmazhatunk. A toxikológiában jelenleg használt jelentősebb mérőszámok még az ENSZ Egészségügyi Világszervezete (WHO) és Mezőgazdasági és Élelmezési Világszervezete (FAO) által definiált és nyilvántartott NOEL/NOEC és ADI értékek. A NOEL/NOEC (*no observed effect level/concentration* – megfigyelhető hatást ki nem váltó dózis/koncentráció), a vizsgált anyag azon legnagyobb mennyiségét jelenti, amely még nem okoz semmilyen észlelhető változást a tesztorganizmokon. Az ADI (*acceptable daily intake* – megengedhető napi bevitel) adott anyagból az elfogadható napi beviteli szintet jelenti mg/testtömeg kg mértékegységben (Polgár, 2006). Ez azt a növényvédőszermaradék-mennyiséget jelenti, melyet a megállapításakor rendelkezésre álló összes tudományos és kísérleti eredmény alapján egész életünk során minden érzékelhető egészségkárosító hatás nélkül elfogyaszthatunk. Az ARfD (*acute reference dose* – akut referenciadózis) mg/testtömeg kg egy hatóanyag testsúly alapján megadott becsült mennyisége, amelynek egy humán populáció (az érzékeny alcsoportokat is beleértve) rövid időn át (24 óra vagy kevesebb) kitehető anélkül, hogy az élettartam alatt ez ártalmas hatások értékelhető kockázatával járna (Solecki et al., 2005).

Az akut és krónikus toxicitás meghatározása a növényvédőszer-hatóanyagok engedélyezési folyamatában fontos szerepet játszik. A vizsgálatok egyik részének célja az adott vegyszer emberekre való veszélyességének feltárása, míg másik része a nem-célszervezetekre vonatkozó mellékhatásokat vizsgálja.

Humán szempontból kiemelkedően fontosak a patkányvizsgálatok (*Rattus norvegicus*), emellett gyakran használnak nyulat (*Oryctolagus cuniculus*), tengerimalacot (*Cavia porcellus*) és kutyát (*Canis lupus familiaris*), de szükség esetén más fajokat is (pl. kecske). Humán szempontból fontos elvégzendő vizsgálatok az etetési, akut dermális, inhalációs, bőrirritációs, bőr szenzibilizációs és genotoxicitási tesztek (Darvas, 2006b). *In vitro* emlős citogenetikai és emlős sejten végzett génmutációs eljárások mellett rágcslók testi sejtjeinek *in vivo* sejtmagvacska tesztje, illetve csontvelőben végzett kromoszóma és citogenetikai tesztek végrehajtása kötelező. Baktériumokkal (pl. *Salmonella typhimurium*) *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat is el kell végezni. Hosszú távú hatások felderítésére krónikus toxicitási (2 éves etetési teszt patkányon), karcinogenitási (egéren – *Mus musculus*), reprodukív toxicitási (patkányon és nyúl) és késleltetett neurotoxicitási teszteket (házityúkon – *Gallus gallus domesticus*) végeznek (91/414/EGK tanácsi irányelv).

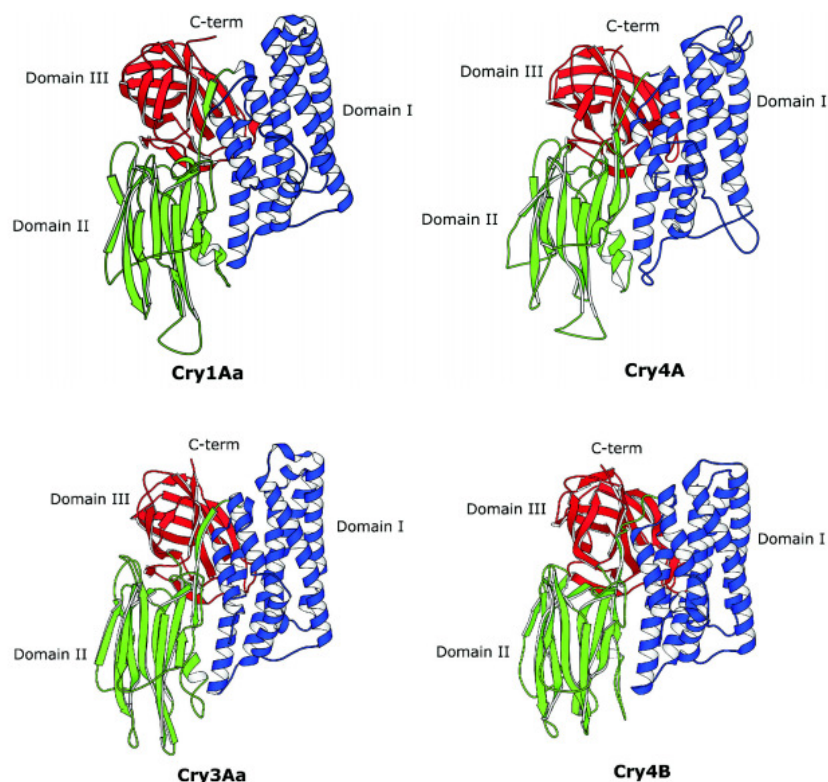
Az ökotoxikológiai szempontból megkövetelt vizsgálatokat számos taxon számos modellfaján el kell végezni. Akut toxicitás meghatározására az alacsonyabb rendű szárazföldi állatok közül leginkább a mézelő méh (*Apis mellifera*), valamint talajlakó földigiliszták (főként *Eisenia fetida*) és ugróvillások (pl. *Folsomia candida*) alkalmasak. Nagyon fontos vizsgálni a célszervezetek (pl. fitofág atkák) ragadozóit és parazitoidjait (pl. *Typhlodromus pyri* és *Aphidius rhopalosiphii*). Az alacsonyabb rendű vízi gerinctelenek esetén különbséget kell tenni az állóvízi, és a folyóvízi, illetve az itt található eltérő tulajdonságú életterek élőlényei között. A bentosban – vagyis a víz-szilárd test fázishatárán – élő állatok közül a csővájó féreg (*Tubifex tubifex*), a – planktonban – azaz a vízben lebegő élőlényközösségben – előfordulók közül a *Daphnia*- fajokat alkalmazzák leggyakrabban a toxicitási tesztekben (Polgár és Schmera, 2006). Vízi gerinctelenek esetében a krónikus vizsgálatokba főként *Daphnia* fajokat vonnak be, emellett egy tetszőleges vízi rovar- és csigafajon mért eredményeket is közölni kell. Herbicidek esetében az alga növekedésre gyakorolt hatást is vizsgálni kell (pl. *Selenastrum capricornutum* vagy *Pseudokirchneriella subcapitata* fajokon). Az üledéklakók modellállataként gyakran választják az árvaszúnyog fajokat (*Chironomus* sp.). Vízi gerincesek közül gyakran használt tesztállatok a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), a ponty (*Cyprinus carpio*), de kedvelt teszt faj a zebradánió is (*Danio rerio*). A halak esetében az akut teszteken felül krónikus vizsgálatokat is végeznek (pl. halivadékok krónikus vizsgálata, halakon mért bioakkumuláció). A halakon mért toxicitási eredmények általában összhangban vannak a vízi ízeltlábúakon (*Daphnia* spp.) mért toxicitással. A szárazföldi gerincesek kijelölt modellszervezetei elsősorban madarak, közülük elsősorban a tőkés réce (*Anas platyrhynchos*), a japán fürj vagy virginiai fogasfürj

(*Coturnix japonica*, *Colinus virginianus*) és a házityúk gyakori modellállatok mind akut etetéses, mind hosszútávú tesztekben (91/414/EGK, tanácsi irányelv).

A krónikus toxicitás felismerése adott populációban nem könnyű, követő és visszatekintő tanulmányokat igényel. Meghatározására reprodukciós-, teratogenitási (rendellenes fejlődési), karcinogenitási (rákkeltő) és mutagenitási (az örökítő anyag megváltozása) teszteket használnak. Ezek egy részét az akut toxicitási tesztekben alkalmazott szervezeteken végzik. A gerinceseken végzett *in vitro* vizsgálatokhoz gyakran izolált sejtvonalakat alkalmaznak. Ezek a tesztek mind osztódásban lévő sejtek vizsgálatára irányulnak, a használt sejtípusok többnyire egérből, patkányból vagy hörcsögből származó petesejtek, limfociták vagy fibroblasztok, de gyakoriak a humán sejtvonalakon (pl. humán placenta sejtvonal – JEG-3) végzett vizsgálatok is. Ezen *in vitro* tesztek segítségével kromoszómaaberráció, DNS-törés, mikronukleusz-képződés, örökletes transzlokáció, soron kívüli DNS-szintézis és testvérkromatid-csere is kimutatható (FDA, 2000). A mutagén vegyületek több mint feléről később derül ki, hogy egyidejűleg karcinogén, azaz rákkeltő is. A teratogenitás embrionális torzfejlődést idéz elő, amit fajspecifikus hatásként kezelnek, így az egy fajon teratogénnek bizonyult vegyület még nem vonja feltétlenül maga után a tiltást. A hormonmoduláns vegyületek a szexszteroid hormonok (ösztrogén, tesztoszteron) területén okoznak általában agonista típusú hatásokat. Krónikus hatásnak tekinthető az immunrendszer védekezőképességének megváltoztatása, az immunmoduláns hatás is (Colborn et al., 1993).

2.2. A Cry-toxinok általános jellemzése

A *Bacillus thuringiensis* (Bt) aerob, Gram-pozitív, endospóráképző, rovarpatogén baktérium, mely patogénként rovarokban, illetve a talajban van jelen. 1901-ben Japánban izolálták elsőként a selyemlepke (*Bombyx mori* L.) hernyójából, ezt követően 1915-ben Berliner egy rovarfajból írta le, ennek köszönhetően merült fel növényvédelmi alkalmazásának lehetősége (Hilbeck és Schmidt, 2006). A legtöbb *B. thuringiensis*-törzs közös jellemzője, hogy sporulációja során parasporális testet képez, amely egy vagy több δ -endotoxinból és néhány esetben parasporinból áll (Höfte és Whiteley, 1989). A vegetatív fázisban exotoxinok (α -, β -, M- stb.) és Vip-toxinok (*vegetative insecticidal protein*) is termelődhetnek. A δ -endotoxinoknak két nagy csoportja ismert: a Cry (*crystalline*)- és Cyt (*cytolytic*)- toxinok, melyek a célsejtek membránján pórusokat képeznek. A Cry-toxinok lektin természetű fehérjék (Bravo et al., 2007).



3. ábra. A Cry-toxinféherjék doménszerkezete (Angsuthanansombat et al., 2004)

A Cry-toxinféherjék három doménből álló, szerkezetileg hasonló vegyületek (3. ábra). Fehérjealegységeik a következők: egy α -hélix (I. domén), mely a membránba épülésben és a pórusképzésben játszik szerepet; egy β -lemezekből felépülő egység (II. domén), melynek a receptorhoz kötődésben van szerepe és magáért a toxikus hatásért felelős; valamint egy további β -lemezekből felépülő egység (III. domén), melynek a receptorfelismerésben és az ioncsatorna nyitásában van szerepe. Két α -hélix körülvész egy β -lemezt, egyszerű α - β domént alkotva (Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2007).

Eddigi kutatások során számos szerotípust és alcsoportot különítettek el, s így több különböző szerovariánst (patotípust) írtak le (Lecadet et al., 1999). Több *B. thuringiensis*-törzs többféle toxint is termel. Legújabb filogenetikai rokonság alapján osztályozták újra a Cry-toxint termelő géneket és a toxinokat, így a Cry-toxinok 55 főtypusba sorolhatóak (Cry1-Cry55). Ezeken kívül megkülönböztetünk altípusokat is, mint pl. Cry1Aa (Crickmore et al., 1998). Emellett több olyan toxin is ismert, melyeknek a felsoroltaktól eltérő a szerkezete. Ilyenek a bináris szerkezetű Bin (bináris) és az Mtx (moszkiticid) típusú Cry-toxinok, valamint a Vip-toxinok (Bravo et al., 2007). A Cry-toxinok osztályozhatóak gyakorlati

szempontból is, mivel célcsoportjukat tekintve „rendsztű” specifikitást mutatnak, ez alapján öt csoport különíthető el (1. táblázat).

1. táblázat: A Cry-toxinok csoportosítása célszervezetek alapján (Darvas, 1999b; van Frankenhuyzen, 2009)

Toxin	Fő célcsoport	Főbb termelő <i>B. thuringiensis</i> szerotípusok
Cry1	Lepidoptera	<i>kurstaki, thuringiensis, aizawai, entomocidus</i>
Cry2	Lepidoptera, Diptera	<i>kurstaki</i>
Cry3	Coleoptera	<i>tenebrionis, morrisoni, san diego</i>
Cry4	Diptera lárvák	<i>israelensis</i>
Cry5	Nematoda	*

* módosított *B. thuringiensis*

Az általam vizsgált Cry-toxinok táplálkozás során (*per os*) jutnak be a célszervezetbe, majd többlépcsős folyamat eredményeként a rovarok középbelében a sejtek lízisét (mikrosebzéseket), végül az állat pusztulását okozzák. A rovarok belébe kerülő protoxin a középbel proteázainak hatására ~70-130 kDa tömegűről ~55-65 kDa méretű aktív toxinokra bomlik. Az így létrejött toxinok specifikus receptoraikkal a bélhámsejtek sejthártyájához reverzibilisen kötődnek, majd a kötés hatására oligomerizálódnak, így a kötés irreverzibilissé válik. A lipidmembránba ékelődés hatására a sejt ionháztartása felborul, a sejthártyán pórus nyílik, és a bél perisztaltikája leáll (Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2007). A mikrosebzéseken keresztül a baktérium vegetatív teste bejut a lárvák testüregébe, és szepszist idéz elő (Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2007). Mivel ebben a helyzetben a szepszist bármelyik jelenlévő baktérium létrehozhatja, emiatt a *B. thuringiensis* vegetatív test jelenlétére nincs szükség, a Cry-toxin elegendő a hatáskifejtéshez. Ez a felismerés vezetett el a Cry-toxint tartalmazó készítmények használatához, majd később a *Bt*-növények kifejlesztéséhez (Broderick et al., 2006; Székács és Darvas, 2012a). A Cyt-toxinok a Cry-toxinoktól eltérően nem kötődnek fehérjereceptorokhoz a szúnyogok középbelében, ehelyett közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a membránlipidekkel, beépülnek a sejtmembránba és pórusokat formálnak (Gill et al., 1987) vagy detergens hatást kiváltva károsítják azt (Butko, 2003).

A Cry-toxinok felhasználásának jelenleg alapvetően három fő területe van: növényvédelmi permetezés, csípőszúnyog lárvák elleni védekezés és a transzgenikus kártevőrezisztens növények alkalmazása.

2.2.1. A Cry4-toxin felhasználása

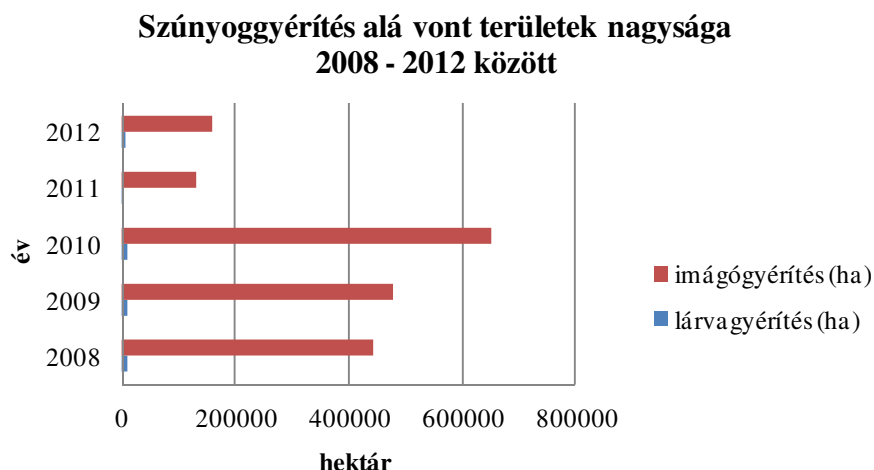
1976-ban a Negev-sivatag időszakos kisvizeiből gyűjtött elpusztult szúnyoglárvákból izolálták először a *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (*Bti*) néven leírt szerotípust (Goldberg és Margalith, 1977). A *Bti* fehérjék kiemelkedően toxikusak *Aedes*, *Culex* és *Anopheles* fajokon, melyek humán betegségek vektorai (Margalith és Ben-Dov, 2000), míg a nem célszervezeteket a korábban alkalmazott hatóanyagokhoz képest kevésbé károsítják (Becker, 2000). L₄-es lárvastádiumú szúnyoglárvákon mért LC₅₀ értékük 10-13 ng/ml. A *Bti*-készítmények különböző formái világszerte elterjedtek, és főként a maláriával fertőzött trópusi területeken nagy szerepet játszanak a fertőzés továbbterjedésének csökkentésében (Tóth, 2009). Napjainkban számos új, specifikusabb törzseket fedeznek fel és alkalmaznak a szúnyoggyérítés gyakorlatában. Jelenleg kereskedelmi forgalomban a H-14 szerotípusú törzs kapható (*EU Pesticide Database*, <http://ec.europa.eu>).

A *Bti* esetében a főhatást 4 nagy molekulatömegű fehérje váltja ki: Cry4A (125 kDa), Cry4B (135 kDa), Cry10A (58 kDa) és Cry11A (68 kDa) (Delecluse et al., 1996). Emellett jelen vannak Cyt-toxinok is, melyek lipidekhez kapcsolódnak, és nem mutatják a Cry-toxinokra jellemző kötődési mechanizmust (Federici et al., 1990; Priest 1992). Aminosavszekvenálás során kimutatták a kapcsolatot a *Bti* által termelt és az egyéb Cry-toxinok között, a Cyt1A-toxin azonban mind szekvenciájában mind toxikológiájában különbözik tőlük (Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998). A Cyt-toxinok számos gerinctelen és gerinces sejtvonalon *in vitro* citolitikus aktivitást mutattak (Thomas és Ellar, 1983), és fontos szerepet játszanak a Cry-fehérjék ellen kialakuló rezisztencia késleltetésében (Georghiou és Wirth, 1997). A *Bti* nagyfokú toxicitása azon szinergisztikus kölcsönhatásoknak köszönhető, amely a Cry-fehérjék, illetve a Cyt1A- és Cry-fehérjék között jönnek létre, tekintve, hogy a Cyt-toxin a Cry11-receptoraként funkcionál a szúnyog középbelében (Ibarra és Federici, 1986; Perez et al., 2005).

Napjainkban számos tanulmány született arra vonatkozóan, hogy a *Bti* képes lehet túlélni és szaporodni a környezetben, ezáltal folyamatos szelekciós nyomást gyakorol a szúnyogpopulációkra, így csökkentve a kapcsolatos készítmények hosszútávú hatékonyságát. Már néhány generáció alatt akár 30-szoros rezisztencia alakulhat ki a toxinnal szemben (Paris

et al., 2011). Francia kísérletben, PCR-es karakterizálás és immunológiai analízis során megállapították, hogy a Rajna-Alpok régió természetes szúnyog tenyészőhelyein megtalálható *Bti*-törzsek genetikailag nem a világszerte ismert természetes genotípushoz, hanem a kereskedelmi forgalomban kapható készítményben jelenlévő törzshöz állnak közelebb (Tilquin et al., 2008). A rezisztencia kialakulásáról szóló tanulmányok megnyitották az utat az alternatív törzsek keresésének irányába. Kínai kutatók Dél-Kínában talajmintákból izolálták a *Bt* S2160-1 törzset, melynek szúnyogellenes hatása összemérhető a *Bti* aktivitásával, bár toxinjainak típusa eltér egymástól (Zhang et al., 2012).

Magyarországon a malária az 1950-es években szorult vissza, ekkortól a szúnyogok elleni védekezésben a járványügyi megfontolások helyett elsősorban turisztikai és lakossági szempontok kerültek előtérbe. A Balaton környékén a 70-es években kezdődött a szúnyogok elleni rendszeres védekezés (Tóth, 2009). A *Bti* hatóanyag felfedezését követően a kereskedelmi forgalomban hamarosan megjelentek az első készítmények (pl. Teknar, Skeetal, Vectobac), 1986-ban pedig Magyarországon is *Bti*-készítményt kezdtek alkalmazni (Erdős et al., 2001). A kijuttatás eleinte szuszpenzió formájában, légi úton történt, majd a 90-es évektől jelent meg a granulátum formula. A hazai első kísérletekben az Abbott (USA) és a Sandoz (Svájc; utódja Novartis, majd Syngenta) cégek *Bacillus thuringiensis* serovar. *israeliensis* készítményeit használták. A laboratóriumi és szabadföldi kísérletek egyértelműen megerősítették a *Bacillus thuringiensis* serovar. *israeliensis* csípőszúnyoglárvákra gyakorolt hatásosságát. A készítményeknél már 1 ppm dózisban az első két órában jelentékeny mortalitás mutatkozott, és 10 óra múlva már 100% mortalitást észleltek (Zöldi et al., 2005). Az Országos Epidemiológiai Központ adatai alapján a szúnyoglárváállomány-gyérítésen átesett területek nagysága (2012-ben ~6000 ha) messze elmarad a légi úton végzett imágó állomány-gyérítés területi arányától (2012-ben ~160 000 ha). Az 4. ábrán is látható, hogy 2008 és 2012 között Magyarországon meghatározó mértékben főként imágóállomány-gyérítés folyt.



4. ábra. Szúnyogállomány-gyérítés alá vont területek nagysága 2008 és 2012 között (Zöldi és Papp, 2013)

Bár a Cry4-toxin fő felhasználási területe napjainkban a szúnyogállomány-gyérítés, kismértékben gombamuslicák (*Mycetophilidae*, Diptera) ellen, illetve üvegházi használatra is alkalmazható. Ez alapján elmondható, hogy mind növényvédelmi célzatú szerként, mind közegészségügyi irtószerként (biocid termék) forgalomba kerülhet (Copping, 2001).

2.2.2. A Cry1Ab-, Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinok felhasználása

A szintetikus növényvédő szerek kezeléseinek kiváltásának kutatása az egyik jelentős iránya a mai mezőgazdaságnak. A *Bacillus thuringiensis* toxinok növényvédelmi felhasználásának két útja van: toxintartalmú készítmények kijuttatása, illetve toxint termelő növények létrehozása géntechnológia segítségével. Az első *Bt*-tartalmú rovarölő szert 1938-ban Sporeine néven hozták forgalomba Franciaországban. Magyarországon (és az Európai Unióban) jelenleg a Cry-toxin tartalmú készítmények permetezőszerként történő használata engedélyezett. 80% Cry1 és 20%-ban Cry2 toxinokat tartalmaz a Dipel® nevű készítmény (3,2% *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), amely por és folyékony alakban is forgalmazható. A Cry3 tartalmú Novodor® nevű készítmény (3% *B. thuringiensis* serovar. *tenebrionis*) folyékony alakban elérhető (Darvas, 1999a). Jelenleg Magyarországon mindkét készítmény a Biokontroll Hungária Nonprofit Kft. besorolása alapján ökológiai termesztésben használható készítmény. A Dipel® bizonyos kultúrákban légi úton is permetezhető.

A Cry-toxinokat termelő transzgenikus növények megjelenésétől – a növényvédő szerek visszaszorításának ígérete nyomán – nagy áttörést vártak. Az első transzgenikus növény az

1983-ban előállított *Agrobacterium* Ti-plazmid rendszerrel módosított dohány volt. A legkorábbi termesztési célú kibocsátás 1993-ban történt, amikor Kína vírusellenálló dohány termesztését kezdte meg. A növény genomjába a *Bacillus thuringiensis* baktérium által termelt fehérjét kódoló génszakaszt építették be, így annak expressziójára azután a növény is képes. Az így létrehozott toxintermelő növény növényvédelmi értelemben analóg a toxint közvetlenül a környezetbe juttató készítményekkel. A növényben a Cry-toxin a kártevő megjelenésétől és aktuális népességdinamikai jellemzőitől függetlenül, a növénybe ültetett génkonstrukció és a növény genetikai programja által szabályozott mértékben folyamatosan termelődik, s ezzel állandó környezeti terhelésként van jelen (Darvas 1997, 1999b). A *Bt*-növények előállításának több módja lehet. Az egyik módszer az endotoxinok termeléséért felelős *cry*-géneket tartalmazó plazmidok izolálása, majd a rovarrezisztencia kialakulásáért felelős génkonstrukció közvetett (pl. vírus- vagy agrobaktérium-közvetített génátvitel) vagy közvetlen (pl. vákum, részecskebombázás, elektroporáció) bejuttatása a célszövet sejtjeibe (Heszky, 2011). Az előállítás másik módja lehet a hibridképzés, amikor a *Bacillus thuringiensis* két szerotípusát konjugáltatják, ennek során a plazmidok új rekombinációja állítható elő. Ezzel a módszerrel olyan transzgenikus növényeket hozhatnak létre, amelyek egyszerre több új tulajdonsággal is rendelkeznek. Transzgenikus növények előállíthatók CellCap[®] eljárás során is, ahol a klónozásra használt, elhalt sejt fala által létrehozott mikrokapszula tartalmazza az endotoxinokat (Darvas és Lauber, 2006; Székács és Darvas, 2012a).

A *Bt*-kukoricák alkalmazásának legnagyobb előnyeként a magasabb terméshozamot szokták említeni (Betz et al., 2000). A hatóanyag nincs kitéve az olyan kedvezőtlen környezeti tényezők hatásának, mint az UV-sugárzás és a csapadék (Takács et al., 2009), ezzel szemben a toxintartalmú készítmények esetében a környezeti hatások erősen csökkentik a hatékonyságot (lebomlás napfény hatására, lemosódás eső által) (Roh et al., 2007). A hozamnövekedés a Cry1-kukorica esetében a kukoricamoly-kártétel függvénye, ami hazánkban nem jelentős: a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (MgSzH, a NÉBIH jogelődje) vizsgálatai 0–5% esetleges, szignifikánsan nem elkülönülő termésnövekedést jeleztek elő az ún. izogenikus vonalhoz képest (Füsti Molnár, 2007). A folyamatosan termelődő Cry-toxin segítségével a termés folyamatos védelmet élvez a kártevők ellen. Előnyt jelent az is, hogy a Cry-toxinok rovarokra nézve bizonyos rendszintű specifitást mutatnak, ezáltal specifikus védelmet nyújtanak a növény számára. A technológiától azt várták, hogy a rovarrezisztens GM-fajták, -hibridek monokultúrában is termesztethetővé válnak, a rovarkártétel veszélye nélkül. Így a *Bt*-növényeket alkalmazó területeken nincs

szükség a továbbiakban szélesspektrumú rovarölőszerek használatára; védekezés nélkül sem nő meg a kártevők által okozott veszteség (Qaim és Zilberman, 2003). Ez azonban kukoricamoly-ellenálló kukorica esetén hazánkban nem igazolható. E kártevő előfordulása ritkán (kb. 10 évente) és csak foltokban jelentkezik, emiatt a gazdák nem védekeznek ellene (Darvas és Lauber, 2007). A legújabb fejlesztésű GM-kukoricahibridek már nemcsak egy, hanem egyszerre több transzgént is tartalmazhatnak, így több tulajdonságban is módosítottak. Lehetnek egy időben moly- és bogárrezisztensek, *glyphosate* és *glufosinate* herbicidekkel szemben toleránsak, amitől azt remélik, hogy a jövőben egyszerre megoldhatóvá válhat a gyomirtás és a rovarkártevők elleni védelem (Heszky, 2008). Kukoricánál maradvá megoldatlan a talajlakó kártevők, a levéltetvek és takácsatkák elleni védelem, illetve ezen túlmenően egyetlen kukoricakórokozó ellen sem fejlesztettek ki hatékony biotechnológiai védekezést.

A *Bt*-növények felhasználása bizonyos területeken jelentős előnyökkel jár, viszont alkalmazásuk során figyelembe kell venni számos kockázatot is. Genetikai szempontból a génáramlás és a génmegszökés jelentenek problémát. A transzgénáramlás során a transzgenikus pollen átkerül valamilyen más növényre, ennek következtében a fajta- és fajhibridek (intra- és interspecifikus hibridképződés) képződése is reális kockázattá válik. A génmegszökés során a transzgén viselkedése, kifejeződése kikerül az emberi kontroll alól, nem megfelelő technológia esetén a transzgenikus növényi részek keveredhetnek a nem-transzgenikus növényekkel (Heszky, 2007). A génáramlás, génmegszökés kockázatának fennállása esetén számolni kell a koegzisztencia problémakörével is. A koegzisztencia a GM-fajták és a hagyományos fajták egyidejű és egy adott helyen történő termesztését és nemesítését jelenti úgy, hogy a termés az Európai Unió követelményeinek megfelelően, miszerint a maximális GMO tartalom 0,9% lehet a hagyományos termékeknél és 0,0% a biotermékek esetében. Ez az idegenbeporzású növények esetében azonban nem tartható hosszútávon (Heszky, 2006). A szélbeporzású kukorica esetében az intraspecifikus hibridképződés jelentős probléma, melynek csökkentésére izolációs távolságot kell betartani a GM-kukoricatáblától. Hazai vizsgálatok alapján jelentős különbség van az árukukorica (van pollenkompetíció) és vetőmagkukorica (nincs pollenkompetíció) esetében szükséges izolációs távolság nagysága között (Darvas et al., 2011).

A toxinnal szembeni rezisztencia és keresztrezisztencia viszonylag rövid időn belül kialakulhat (Darvas és Lauber 2007; Székács és Darvas, 2012a). A rezisztencia kialakulásának késleltetésére 20-50% arányú szegélyvetést, ún. „nagy dózis/menedék” termesztési módot dolgoztak ki, amely az érzékeny kártevő népességet fenntartják. Így

azonban tulajdonképpen a kártevők tenyésztése történik egy adott területen, állandósul a kártétel (Takács et al., 2009).

Ökológiai szempontból számolni kell azzal, hogy a Cry-toxin folyamatosan termelődik, minden növényi sejtben, eltérő mértékben ($45\text{--}9500\text{ ng toxin g}^{-1}$) a növény egész élete során. Legnagyobb mennyiségben a levélben képződik, majd a szárban, termésben, gyökérben, portokban és végül a legkisebb mennyiség a pollenben található meg. A folyamatos termelődésnek köszönhetően a Cry1-toxin hosszú ideig a környezetben marad, ezzel veszélyeztetve az ökoszisztémát. A Dipel® készítmény – melyben előlt *B. thuringiensis* baktérium található – engedélyezett dózisához képest a *MON 810 Bt*-kukorica a termesztési időszak során 50-1500-szer több Cry1Ab-toxint termelt hektáronként. (Székács és Darvas, 2007; 2012a). Elmondható, hogy *Bt*-növények nem felelnek meg az integrált növényvédelem (IPM – *integrated pest management*) elveinek, hiszen használatuk nem korlátozódik a kártétel fellelérésének időtartamára, és nem érvényesítenek az alkalmazásra vonatkozó kártételi küszöbértéket sem. A termelődő Cry1Ab-toxin a tarlómaradványban is megmarad, hatása a lebontásban és a talajt alkotó mikrobiális közösség alakításában még nem teljesen feltárt. A transzgenikus növény gyökerében termelődő Cry1-toxin a gyökérváladékkal és a gyökérsejtek hámlásával folyamatosan a talajba jut (Székács és Darvas 2007). Mérések szerint a tarlómaradvánnyal a talajba kerülő Cry-toxin 1–8%-a mérhető vissza egy év elteltével. A Cry1-toxin további sorsa és hatása a talajban nagyrészt annak típusától függ. Adszorbeálódhat a talajalkotórészek felületén, főként az agyagszemcséken, ezáltal védett lesz a lebontással szemben, viszont rovarpatogén tulajdonságát kötött állapotban sem veszíti el. Különböző vizsgálatok bizonyították, hogy a Cry1-toxin patogenitása több mint 6 hónap elteltével is mérhető (Tapp és Stotzky 1998; Koskella és Stotzky 1997).

A nem célzott szervezetek is ki vannak téve a Cry-toxinok hatásának a tápláléklánc minden szintjén. A fitofág élőlények elfogyaszthatják a transzgenikus növények elszáradt vagy friss részeit, melyek a termőterületől szél, víz vagy egyéb hordozó útján több száz méterre is kerülhetnek. Időszakos lefolyások, öntözés, esőzés hatására vizes élőhelyekre is kerülhetnek, így hatással lehetnek a vízi élőlényekre. Nagy mennyiségű növényi szerves anyag bejutása önmagában is veszélyes, a toxintartalmú maradványok bejutása azonban, a lebontó szervezeteket károsító tulajdonságaik miatt, méginkább kockázatos. Számolni kell az eutrofizáció kialakulásának lehetőségével is, amely a vízminőség romlásához vezethet. Az élővizekbe került Cry-toxintartalmú növényi törmelék, illetve a Cry-toxintartalmú pollen igen hosszú utat is megtehet lebomlás nélkül, a növényi maradványok akár 180 m-t is megtehetnek, míg a pollen akár 2 km távolságból is kimutatható (Rosi-Marshall et al., 2007).

Rosi-Marshall és munkatársai kimutatták azt is, hogy a vizsgált *Bt*-kukoricafajta és a hagyományos kukoricafajta növényi maradványainak vízben való lebomlásának ütemében nincs különbség, viszont a laboratóriumi etetési kísérletek során megállapították, hogy a *Bt*-kukoricával etetett egyes tegzes fajok sokkal lassabb fejlődést mutattak (Rosi-Marshall et al., 2007). Bøhn és munkatársai a vízminőség romlását kitűnően jelző nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) vizsgálták a Cry1Ab-toxintartalmú kukoricaszemek örleményének fejlődésre és szaporodásra gyakorolt hatásait. Vizsgálataik során mindkét esetben gátló hatást tapasztaltak (Bøhn et al., 2010). A ragadozók és a paraziták a zsákmány vagy a gazdaszervezet által károsodhatnak, amelyek előzetesen fogyasztottak Cry-toxint tartalmazó táplálékot. A szaprofita szervezetek által a talómaradványok közvetlenül fogyasztásra kerülhetnek. A talajban élő egyes ugróvillásfajok táplálékválasztási tesztben kevésbé preferálták a Cry1-toxint tartalmazó kukorica maradványait a hagyományos kukoricához képest, illetve ezen a táplálékon a szaporaságuk is csökkent (Bakonyi et al., 2006). Mivel a toxin a pollenben is megjelenik, így a beporzást végző rovarok is kapcsolatba kerülhetnek a Cry-toxinnal (Darvas és Lövei, 2006). Bizonyos védett lepke- (*Lepidoptera*) és egyéb rovarfajok is ki vannak téve a toxin károsító hatásának, mivel a Cry-toxintartalmú pollen képes kiüledni a kukoricatáblák szegélyterületén megtalálható csalánfélék (*Urticaceae*) leveleire, így a leveleken élő és azokat fogyasztó lepkehernyókat (pl. nappali pávaszem – *Inachis io*) hernyóit is érintik a toxin lehetséges káros hatásai (Darvas et al., 2004; Lauber et al., 2007). A Cry1-toxin károsíthatja az emberi egészséget és különböző allergiás reakciókat válthat ki. A szervezetben lejátszódó folyamatok még nem teljesen ismertek, ezért számos toxikológiai és allergológiai vizsgálat elvégzésére van szükség minden egyes GM-fajta és termék esetén. A WHO (World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet) állásfoglalása szerint viszont jelenlegi tudásunk alapján a transzgenikus növények nem veszélyesek az emberi egészségre. Ezt a megítélést azonban számtalan kutató nem osztja (Pusztai és Bardócz, 2006). Jól látható azonban, hogy a jól beállított, kockázatokat felmérő laboratóriumi kísérletek mellett (Romeis et al., 2011) megfelelő fél-szabadszíves és szabadszíves modell tanulmányok készítése is indokolt, az esetleges nem-várt mellékhatások felderítéséhez.

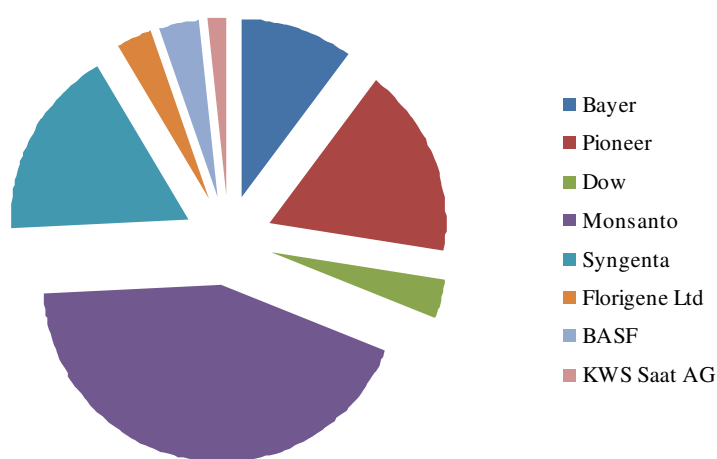
2.2.3. A Cry-toxint termelő növények és a Cry-toxintartalmú készítmények elterjedése

A mezőgazdaságban elterjedt *Bt*-növények főként a világ kukorica-, gyapot-, szója- és olajrepce-termelését érintik (Darvas et al., 2009b). 2013-ban az ISAAA (*International*

Service for Acquisition of Agri-Biotech Applications Mezőgazdasági Biotechnológiai Alkalmazások Nemzetközi Szolgálat) jelentése alapján, a világon összesen 175,2 millió hektáron termesztettek GM-növényeket. Európában Portugália, Spanyolország, Csehország, Szlovákia és Románia termel összesen 148 013 hektáron transzgenikus *Bt*-kukoricát. Spanyolország bizonyul a legnagyobb felhasználónak, az EU-ban vetett *Bt*-kukorica összes területének 94%-a spanyol földön található (James, 2013).

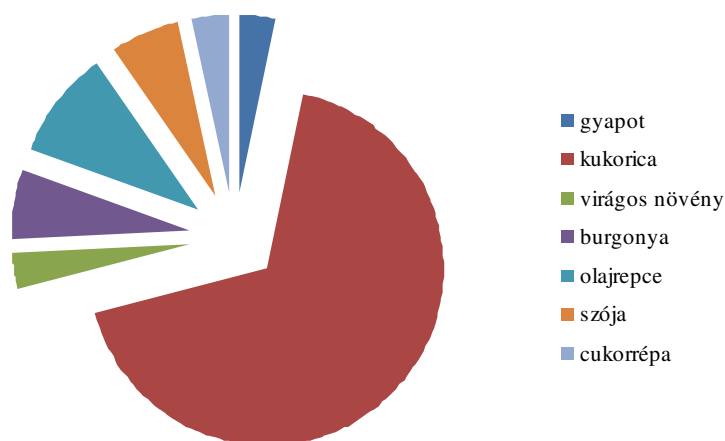
Jelenleg az Európai Unió területén vetési, behozatali és takarmányozási engedélyekkel rendelkezhet módosított növény. Érvényes vetési engedéllyel mindössze egy módosított növény, a *MON 810* kukoricavonal rendelkezik, melynél a módosítás a kártevők elleni védekezést biztosítja, mivel Cry1Ab-toxint termel, ennek köszönhetően a kukorica védett a kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis*) kártételével szemben. Az Európai Unióban 1998-tól egyedülként e kukoricavonal termesztése volt engedélyezett, ez az engedély 2007-ben járt le. Jelenleg kockázatértékelése zajlik az engedélymegújítás folyamatában, emellett azonban továbbra is vethető (ISAAA, 2014). 2010-től a keményítő amilopektin-tartalmának növelése céljából módosított Amylogen HB burgonya is rendelkezett vetési engedéllyel, melyet Magyarország támadott meg az Európai Bíróságon. A 2013. év végi ítélet alapján a vetési engedélyt megsemmisítették, így az Európai Unió területén a továbbiakban nem vethető ez a módosított burgonyafajta (Európai Unió Bírósága, 2013).

A GMO adatbázis alapján jelenleg 9 nagyvállalat érdekelt a transzgenikus növények engedélyeztetésében, a legtöbb engedéllyel a Monsanto, Syngenta és Pioneer/DuPont cégek rendelkeznek (5. ábra).



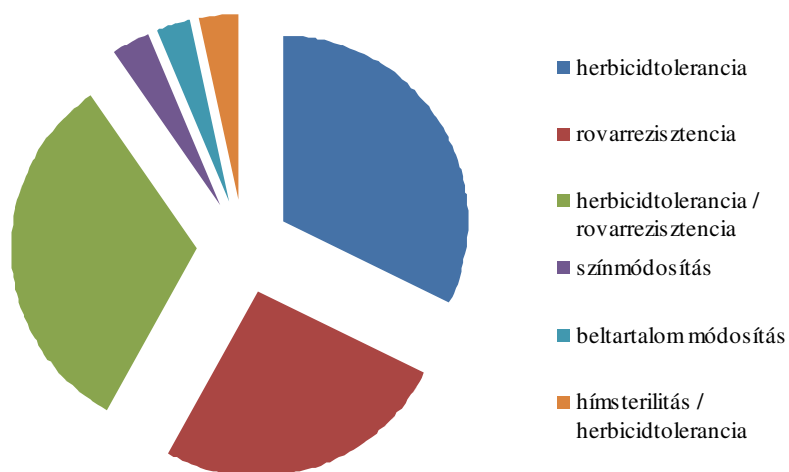
5. ábra. Az EU területén érvényes engedéllyel (behozatal, kísérlet, köztermesztés) rendelkező módosított növényeket előállító cégek megoszlása (<http://www.gmo-compass.org>, 2014. február)

Az EU engedélyek legnagyobb hányadát behozatali és takarmányozási célokra adták ki. Az engedélyek közel 70%-a transzgenikus kukoricára vonatkozik, de a sorban található még olajrepce, szója, cukorrépa, gyapot, burgonya és színmódosított virágos növények is (6. ábra).



6. ábra. Az EU területén érvényes engedéllyel rendelkező (behozatal, kísérlet, köztermesztés) módosított növényfajok megoszlása (<http://www.gmo-compass.org>, 2014. február)

A módosítások elsősorban herbicidtoleranciára, rovarrezisztenciára és e két tulajdonságra egyszerre módosított növényekre vonatkoznak (7. ábra).



7. ábra. Az EU területén érvényes engedéllyel rendelkező (behozatal, kísérlet, köztermesztés) módosított növények módosítási céljainak megoszlása (<http://www.gmo-compass.org>, 2014. február)

Magyarországon a *MON 810* kukoricafajtával szemben 2005-től vetési moratórium van érvényben, ezért vetése itthon csak kutatási célból engedélyezett (Takács et al., 2009). Magyarország új alaptörvényében 2012-től alkotmányos tiltás vonatkozik a genetikailag módosított élőlényekre. Az Alaptörvény az emberek testi-lelki egészségét (jogi értelmezés szerint a tiltás csak ezt veszélyeztető hatásúakra terjed ki) többek között GMO-mentes mezőgazdasággal kívánja biztosítani (Magyarország Alaptörvénye, 2011).

2.3. A kísérleti állatok

2.3.1. Nagy vízibolha (*Daphnia magna* Straus, 1820)

A *Daphnia magna* Straus rendszertanilag az ágascsapú rákok közé sorolható (*Crustacea*, *Cladocera*). Testük vese alakú, áttetsző, csápjaik kétfelé ágaznak (8. ábra). A testüket borító páncélból 4-6 pár mellkasi toldalék áll ki, melyet költőtérnek is használnak, végtagjaik a páncélzaton belül helyezkednek el. A potroh és a potrohvég rendszerint a tor alatt előrehajlik. Az úszás a nagyobb méretű, második pár csáp lefelé irányuló csapkodásával valósul meg. A mellkasi függelékek folyamatos mozgatása a víz egyenletes áramlását idézi elő az oldalnyílások között. A vízben lévő táplálékreszecskéket ($d < 50 \mu m$) a mellkasi lábak sörtéi szűrik ki, majd a lábak alján elhelyezkedő vájat mentén a szájba juttatják. A vízben lebegő fitoplanktonnal, szerves anyagokkal táplálkoznak. Tavasztól kora őszig folyamatos szűznemzéssel és lárvaszüléssel szaporodnak, ha azonban a körülmények nem megfelelőek (pl. alacsony hőmérséklet, táplálékhiány), tojást raknak, melyek egy részéből hímek fejlődnek, így lehetőség nyílik az ivaros szaporodásra. Az eltérő genetikai állományú utódok megjelenése lehetőséget nyújt a megváltozott környezeti tényezőkhöz való jobb alkalmazkodáshoz (Scourfield és Harding, 1958).



8. ábra. *Daphnia magna* nőstény tartós petével (fotó: Fejes Ágnes)

2.3.2. Egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti* L., 1762)

Az *Aedes aegypti* a kétszárnyúak rendjébe sorolható (*Diptera*, *Culicidae*) csípőszúnyogfaj. A viszonylag kisméretű (3-5 mm), sötét színű csípőszúnyog-imágó lábán fehér gyűrűk láthatók. Feje fekete, a csáp vége fehér. Sötét színű torán a pajzsocska fehérén mintázott, szárnyain sötét pikkelyek találhatók. A vérszívás a feltétele a termékeny tojások rakásának. Lárvai (9. ábra) vízben élnek, az aljzaton vízi mikrobióta szervezetekkel, szerves törmelékekkel táplálkoznak, a felszínre légvételkor úsznak fel. Négy lárvastádiumuk van, optimális körülmények között 7-9 nap alatt fejlődnek szabad bábbá, imágóvá további 2 nap alatt alakulnak. Afrikában és az Amerikai kontinensen elterjedtek, főként a tropikus és szubtropikus régiókban (Womack, 1993).



9. ábra. Egyiptomi csípőszúnyog L₃ lárva (fotó: Fejes Ágnes)

Csípőszúnyogként az *Aedes* fajok kiemelt vektorai olyan fertőző betegségeknek, mint a malária, a dengue-láz, sárgaláz vagy a nyugat-nílusi láz. E megbetegedésekre figyelmet kell fordítani hazánkban is, mivel az éghajlati viszonyok kedvezőbbé válásával a déli csípőszúnyog fajok élőhelyeinek észak felé terjeszkedésével kell számolnunk (Krisztalovics et al., 2011).

2.3.3. Zebradánio (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822)

A zebradánio népszerű akváiumi halfaj és elterjedt kísérleti állat (10. ábra). A kisméretű (3-5 cm) bento-pelágikus életmódot folytató faj a pontyalakúak rendjéhez tartozik (*Cypriniformes*, *Cyprinidae*). A Gangesz folyóvidéken, Burmán, a Malakka félszigeten és

Szumátrán őshonos (Eaton és Farley, 1974; Talwar és Jhingran, 1991). 26 °C-os víz hőmérséklet mellett gyorsan növő hal, mely a teljes fejlettségét három hónap alatt éri el. Könnyű és gazdaságos beszerezhetősége, egyszerű tenyésztése és tartása miatt kedvelt laboratóriumi modellfaj különböző kutatási területeken (pl. neurobiológia, toxikológia, molekuláris és fejlődésbiológia). A zebradanió embrionális fejlődését lépésről lépésre már korán leírták, mely alapján a fejlődés menetét könnyen tanulmányozható (Kimmel et al., 1988, Kimmel et al., 1995). A vad típusú hímek karcsú, narancssárga színű csíkokat hordanak kék csíkjaik között, a teltebb nőstényeknél ugyanott ezüstszerű csíkok figyelhetők meg, színeik kevésbé élénkek. Hátuk olajbarna, az oldalak és a has alapszíne sárgásfehér. Törzsén a kopolyúfedőtől a farkúszó végéig négy sötét acélkék csík húzódik. A csíkozottság a farok alatti úszóra is áttér. A hátúszó alapszíne sárgásbarna, kék szegéllyel, kívül fehérén szegélyezett. A kopolyúfedő kék fehér foltokkal. Farok- és hasúszói fátyolszerűen megnyúlhatnak, melyek akár a testhossz egyharmadát is kitehetik (Laale, 1977).



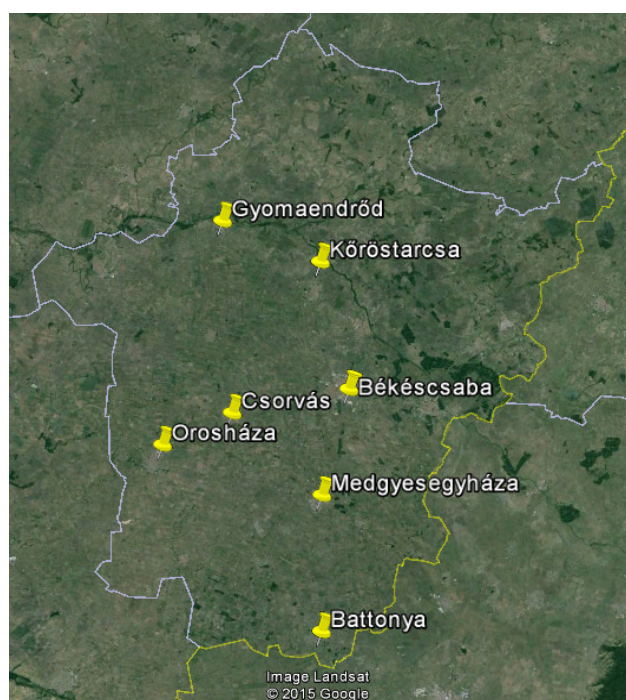
10. ábra. Kifejlett egyedekből álló zebradanió-csapat (fotó: Fejes Ágnes)

3. Anyagok és módszerek

3.1. Ipari és mezőgazdasági eredetű kémiai szennyezések kimutatása és hatásvizsgálatai

3.1.1. Talaj- és vízmintavétel

A monitoring program keretében a 2008 és 2013 közötti időszakban egyenlőtlen éves eloszlásban érkeztek környezeti minták különböző földterületekről. A vizsgált talaj-, és felszíni vízminták Békés-megye meghatározott mérési pontjairól származtak (11. ábra). A vizsgálatokba ökológiai művelés alá vont és intenzív művelésű mezőgazdasági, valamint ipari területekről származó mintákat választottunk (2. táblázat).



11. ábra. A Békés megyei mintavételi helyek és a vizsgált szennyezett területek földrajzi elhelyezkedése.

A talajmintavételek a környezetvédelmi talajvizsgálatok mintavételi ISO szabványa szerint mélyített talajfúrásokból történtek. Ehhez kézi vagy gépi fúróberendezést alkalmaztak, száraz magfúrós technológiával. A vizsgálati célnak megfelelően nem képeztünk átlagmintákat. Az egyes mintákat a feldolgozási célnak megfelelő teflonzáras üvegedényben tároltuk a vizsgálatok megkezdéséig. A minták mennyisége minimálisan 500 g volt (MSZ 21470/1-80). A talajmintavétel során megfelelő darabszámú, 0,1-0,5 kg talajt vettünk

mintánként. Az egyes mintákra vonatkozóan a mintavétel körülményeit jegyzőkönyvben rögzítettük. A begyűjtött és azonosítóval ellátott mintákat hűtött körülmények közt tároltuk a felhasználásig.

A minták kódolása az alábbiak szerint történt: az első karakter a minta típusát jelzi (V- vízminta, T-talajminta), a második a mintavételi helyre vonatkozik (1 – Gyomaendrőd talaj- és vízminta, 2 – Medgyesegyháza víz-, Gyomaendrőd talajminta, 3 – Csorvás víz-, Köröstarcsa talajminta, 4,5 – Battonya vízminta, 6– Békéscsaba vízminta, 7– Orosháza), míg a harmadik és a negyedik a mintavételi pontra utal (A-G, 0-3).

2. táblázat: A Békés megyei mintavételi pontok jellemzői

Terület típusa	Helyszín	Művelés típusa
Mezőgazdasági	Battonya	intenzív mezőgazdasági
	Battonya	ökológiai
	Battonya	ősgyep
	Csorvás	intenzív mezőgazdasági
	Köröstarcsa	ökológiai
	Medgyesegyháza	ökológiai
Ipari	Békéscsaba	-
	Gyomaendrőd-Nagylapos	-
Közütkelő telephelye	Orosháza	-

A talajvíz-mintavétel eredetileg meglévő, öntözési céllal létrehozott kutakból vagy a területen lévő fúrt kutakból történt. Használatban lévő kút esetében a vízkivételre egyébként használt szerkezet által (szivattyú, hidrofór stb.) kivett vízből történt a vizsgálati mintavételezés. Ez esetben a minta homogén, a használatra jellemző paraméterekkel rendelkezik. Fúrt kútból nyert talajvíz minta az adott rétegre jellemző vízminőséget reprezentálja. A vizsgálati minta mennyisége minimálisan 5 liter volt. A felszíni víz esetében a mintavétel teleszkópos nyelű, a mintavételi edényt rögzítő szerkezettel, merítéssel történik (MSZ 21464:1998, MSZ EN ISO 5667-2:1993). A mintavételi terveknek megfelelő darabszámban megvett vízmintákat a különböző laboratóriumi vizsgálatok során elemeztük.

A munka során 2008 és 2013 között összesen 202 db felszíni- és talajvíz, valamint 423 db talajminta kémiai elemzését végeztük el, évi legfeljebb három mintavételezési ciklusban, az első periódusban a mintavételi térségben kiterjedt és ismételt mintavételezésekkel, ezt követően pedig ezen eredmények segítségével végzett kockázatelemzés alapján, felhasználva a mintavétel-optimalizálásra vonatkozó fejlesztési eredményeinket.

3.1.2. Minta-előkészítés és analitikai vizsgálatok a talaj- és vízminták szennyező anyagainak kimutatására

A talajmintákat beérkezés után kiterítve, levegőn szárítottuk, majd őröltük és szitáltuk. A talajok előkészítésére az analitikai vizsgálatok előtt ultrahangos oldószeres extrakciót alkalmaztunk. Adagonként 10 g talajmintához adtunk 15 ml hexán/aceton (1:1) oldószerkeletet, amelyet 5 perc rázatást követően 20 percig ultrahangos kezelésnek vetettünk alá. Mintánként több (általában 3) extrakciós adag egyesített szűrletét 5000/perc fordulatszámon, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk. Az elegyről 10 ml extraktumot dekantáltunk osztott kémcsőbe, majd vákuumkádban előbb 1 ml térfogatra, végül nitrogénáramban szárazra pároltuk. A bepárlási maradékot 1 cm³ izo-oktánban oldottuk, majd GC-MS vizsgálatnak vetettük alá.

A talajokból a biológiai vizsgálatokhoz vizes talajkivonat-oldatot készítettünk. Ehhez 300 g mintát mértünk ki, melyet az adott területre eső éves csapadék (~600 mm) 1 hónapra átlagolt mennyiségének (1,67 ml g⁻¹) megfelelő desztillált vízzel öntöttünk fel. 10 perc ultrahangos kezelés után a folyadékot vákuum alatt szűrőpapíron átszűrtük, majd 10 percig, 4 °C-on, 3000/perc fordulaton centrifugáltuk. Az így előkészített talajoldatot használtuk fel a vizsgálat során. A minták hatóanyagtartalmát – szilárd fázisú extrakciót (ld. alább) követően – ismételten mértük GC-MS módszerrel, mivel az eltérő extrakció miatt az így kapott eredmény különbözik a szerves oldószeres analitikai minta-előkészítés után mért adatoktól (Nerin et al., 1991).

A vízminták GC-MS vizsgálatához történő előkészítésére szilárd fázisú extrakciót (*solid-phase extraction* – SPE) alkalmaztunk. A SPE technikához nem porózus, grafitizált széntöltetű SPE-oszlopot (CarboPrep-90[®]) használtunk. A homogén, grafitizált széntöltetű a savas, bázikus illetve semleges komponensek egyaránt kötődnek. Az SPE módszer előnye, hogy 500:1 – 1000:1 arányú töményítést (koncentrációt) tesz lehetővé. Az SPE eljárásához az oszlopokat (83,33 mg ml⁻¹) vákuumos szívás mellett 5 ml diklór-metán/metanol (8:2), 2 ml metanol, majd 15 ml 10 mg/ml aszkorbinsavat tartalmazó desztillált vízzel kondicionáltuk,

elkerülve, hogy az oszlop teljesen kiszáradjon. Ezután 1000 ml szűrt és homogenizált mintaoldatot eresztettünk át az oszlopon 10-15 ml/perc áramlási sebesség mellett. Az oszlopot 7 ml desztillált vízzel öblítettük, levegő átszívásával 10 percig szárítottuk, 1 ml metanol/desztillált víz (1:1) oldattal mostuk, majd újra légszárazra szárítottuk. A semleges és bázikus mikroszennyezőket 1 ml metanol, majd 6 ml diklór-metán/metanol (8:2) eluens lassú átfolyatásával oldottuk le. Az egyesített eluátumot nitrogéngáz alatt mintegy 0,1 ml térfogatra betöményítettük, a tömény oldathoz 2 ml izooktánt adtunk, majd 1 ml végtérfogatra töményítettük, s a műszeres analitikai eljárás elvégzéséig 4 °C-on tároltuk. Az előkészített minták növényvédő szerekre vonatkozó hatóanyag-maradványtartalmát mértük GC-MS módszerrel. Kromatográfiás oszlopként a szerves vegyületek széles körének (alkoholok, aminok, aromás és alifás szénhidrogének, észterek, halogéntartalmú vegyületek stb.) elválasztására alkalmas, enyhén poláris tulajdonságú, 5% difenil- és 95% dimetil-polisziloxán töltetű kapilláris oszlopot alkalmaztunk. A talált hatóanyagok analitikai mintáival standard kromatogramokat vettünk fel, illetve ötpontos koncentráció kalibrációt végeztünk (Oldal et al., 2006).

Az analitikai vizsgálataink során 33 aktív hatóanyagot és bomlásterméket (*acetochlor*, *alachlor*, *aldrin*, *atrazine*, *butylate*, *carbofuran*, *carbofuran*, *phenol*, *DDD*, *DDE*, *DDMU*, *DDT*, *diazinon*, *dibutyl phthalate*, *dielldrin*, *endrin*, *endrin ketone*, *EPTC*, α -, β - és γ -HCH, *heptachlor*, *heptachlor epoxide*, *isodrin*, *metolachlor*, *phenkapton*, *phorate*, *prometryn*, *propachlor*, *sulfotep*, *TBP* (tributyl-phosphate), *terbutryn*, *trifluralin*), kapcsolódó összetevőt (AMPA, 2,4-D, 2,4-DB, *dichloprop*, *dimetachlor*, *fenoxycarb*, *glyphosate*, *MCPA*, *MCPB*, *mecoprop*, *metribuzine*, *propisochor*, *simazine*) vagy kémiai csoportot (*camphechlor*) monitoroztunk. Adott teszterületet szennyezettnek tekintettük, ha a szennyező koncentrációja meghaladja a jogszabályban előírt küszöbértéket (a maximális szermaradék szint 0,1 ng/ml egyes növényvédő szerekre vagy 0,5 ng/ml az összes növényvédő szerre, "B" érték a mikroelemekre) (European Parliament and Council, 2006).

A biológiai vizsgálatok eredményeinek értékeléséhez fontos szempont volt a szermaradékszennyezés mellett a toxikus elem-tartalom ismerete is. Ezért az általunk végzett analitikai és biológiai vizsgálatok mellett az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Talajtani Intézetében a talajminták mikroelemtartalmának (As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Zn) vizsgálatát is elvégezték.

A *glyphosate* aktív hatóanyag mérésére kereskedelmi forgalomban kapható, validált ELISA kitet használtunk (PN 500086 by Abraxis LLC, Warminster, PA, USA), *glyphosate*-

specifikus antitestekkel. A kalibrációs görbéhez a standard oldatokat 5 koncentrációban (0,075 és 4,0 ng/ml között), 2 ismételtsben vittük fel. A mátrixhatás méréséhez 1 mg/ml koncentrációjú *glyphosate* törzsoldatot használtunk, amit 0,1 µg ml⁻¹-re hígítottuk (*spike* oldat). A mérés 96 lyukú lemezeken történt a gyártó leírása alapján. Az acilezéssel történő származékképzés után a mintákat és az analitikai standardokat a mikrotiter lemezre vittük fel, melynek falához előzetesen *glyphosate*-specifikus antitesteket rögzítettek. A szobahőmérsékleten történő inkubálás után hozzáadtuk az enzimkonjugátumot. A pufferrel történő mosási lépések után a kolorimetriás szubsztrátot és a kromofóroldatot juttattuk a lemezre. A létrejövő kék szín jelzi a kolorimetriás reakció létrejöttét, ennek fejlődését 620 nm hullámhosszon követtük 1,0 optikai sűrűség (abszorbancia) értékig. Ekkor a színreakció leállításához kénsavat alkalmaztunk, majd a színjelet 450 nm hullámhosszon vettük fel. A *glyphosate* koncentrációját standard kalibrációs görbe lineáris vagy szigmoid illesztésével determináltuk. Mivel a *glyphosate*-konjugátum verseng az antitest kötőhelyeiért a mintában lévő ismeretlen *glyphosate*-tartalommal, a szín kialakulása szigmoid mintát mutat (Mörtl et al., 2013).

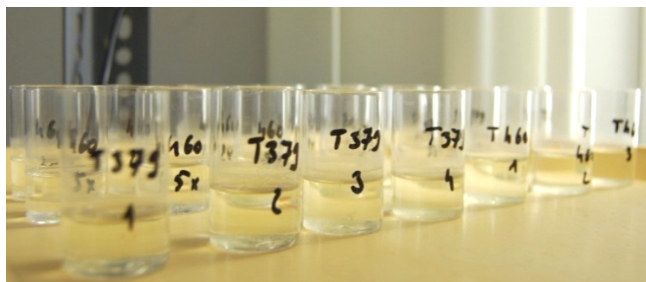
3.1.3. Biológiai teszt módszerek a mintákban előforduló szennyezések káros hatásainak meghatározásához

Az akut immobilizációs tesztet *Daphnia magna* tesztállaton az ISO 6341:1996 (OECD Test No. 202, 2004) szabvány leírása alapján végeztük. A kísérletekhez a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (KÉKI) Ökotoxikológiai Osztályán¹ tenyészetben tartott állatokat használtuk, illetve a 2011-ig elvégzett vizsgálatokhoz az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének² azonos tenyészetét használtuk. A törzstenyészet a CITOLAB (korábbi nevén LAB Research Hungary) veszprémi intézetéből származik. A vízibolhák tartása és tenyésztése a fenti szabvány szerint történt. A tenyészet fenntartása 22 °C-on, napi 16 óra megvilágítás mellett, meghatározott összetételű sóoldatban (későbbiekben: *Daphnia*-tenyészoldat) történik. A tenyészet táplálására főként egysejtű mikroalgák alkalmazhatók, esetünkben a *Pseudokirchneriella subcapitata* (régebbi néven *Selenastrum capricornutum*) zöldalgafaj. A tesztállatok érzékenységeinek meghatározásához a szabvány alapján kálium-dikromát (K₂Cr₂O₇) oldatot használtunk, különböző koncentrációkban

¹ Ma NAIK Agrár-környezettudományi Kutatóintézet

² Az Ökotoxikológiai Osztály a KÉKI előtt itt dolgozott, vagyis a tenyészet ténylegesen változatlan volt.

vizsgálva a tesztállatok alkalmasságát. A teszt alapján a tenyészet megfelelőnek bizonyult a vízmintavizsgálatra, ha az LC_{50} érték az elvárt 0,6 és 1,7 mg/l közé esett.



12. ábra. Az immobilizációs teszt beállítása (fotó: Fejes Ágnes)

A teszt során az állatoknak azt a tulajdonságát használtuk, hogy megfelelő körülmények között szűznemzéssel szaporodnak. Első lépésben a törzstenyészetből kiválogattuk az anyákat, melyek testében szabad szemmel is jól kivehetők a fejlődő utódok. A teszthez az újonnan született, 6-24 órás fiatal állatokat használtuk, ezeket eltávolítottuk az anyák mellől. *Faeces* poharakba a kontrollcsoport esetén 10 ml *Daphnia*-tenyészcsoportot, a tesztcsoport esetén 10 ml mintaoldatot mértünk, a megfelelő koncentrációkban (12. ábra). A teszteket négy ismétlésben végeztük, ismétlésenként 10 állattal. Az állatok mozgását 24 majd 48 óra elteltével vizsgáltuk, az immobilizációs protokoll alapján a mozgásképes egyedeket jegyeztük fel.

A *D. magna* tesztet a környezeti minták mellett a *glyphosate* hatóanyaggal, az ezt tartalmazó növényvédőszer-készítménnyel (Roundup Classic®), illetve a készítmény formázóanyagával (polietoxilált faggyúamin, POEA) is elvégeztük. A Roundup Classic® készítmény mintáját a hazai forgalmazó (Monsanto Hungária Kft.) bocsátotta rendelkezésünkre. A POEA formázóanyag és a *glyphosate* hatóanyag IPA-sójának mintája a Lamberti cég olaszországi gyárából származik (Lamberti S.p.A). A teszt során általunk alkalmazott koncentrációk alapjául Richard és munkatársai 2005-ben közzétett tanulmányát vettük, melyben a Roundup-készítmény 2%-os hígítását alkalmazva humán placentasejtvonalakon toxikus hatásokat mértek (Richard et al., 2005). A teratológiai vizsgálatához hasonlóan, e kiindulási koncentrációt alkalmaztuk, és ezt, illetve ennél alacsonyabb értékeket vettünk fel. A *glyphosate* izopropilamin-sója és a POEA adott koncentrációját a Roundup készítményben megtalálható arányhoz viszonyítva számoltuk ki,

így a kezdeti 2%-os dózis esetén rendre 9,75 g/l és 3,6 g/l értékűnek adódtak. A további koncentrációkat ennek hígításából számoltuk.

A mortalitási/immobilizációs ráta (%) számolása során minden esetben a Henderson-Tilton-képletet használtuk, mely a kezeléseket korrigálja a kontroll kezelés mortalitásával, valamint kiszűri az ismétléseknél esetlegesen előforduló különböző egyedszámok hatását. A továbbiakban a mortalitási/immobilizációs ráta kifejezés alatt a Henderson-Tilton formulával korrigált adatokat értjük. A kísérlet befejeztével probitanalízissel számítottuk az 50%-os mortalitást (illetve ebben az esetben immobilizációt, mivel a szabvány alapján a nem mozgó egyedeket elhullottnak tekintjük) okozó koncentrációkat (LC_{50} -értékek). Ehhez a számításhoz az Microsoft® Office Excel 2003 programot használtuk.

A Henderson-Tilton képlet:

$$M\%(H - T) = \left(1 - \frac{Keu \times Koe}{Kee \times Kou}\right) \times 100$$

ahol

Kee – a kezelt egyedek száma a kezelés előtt,

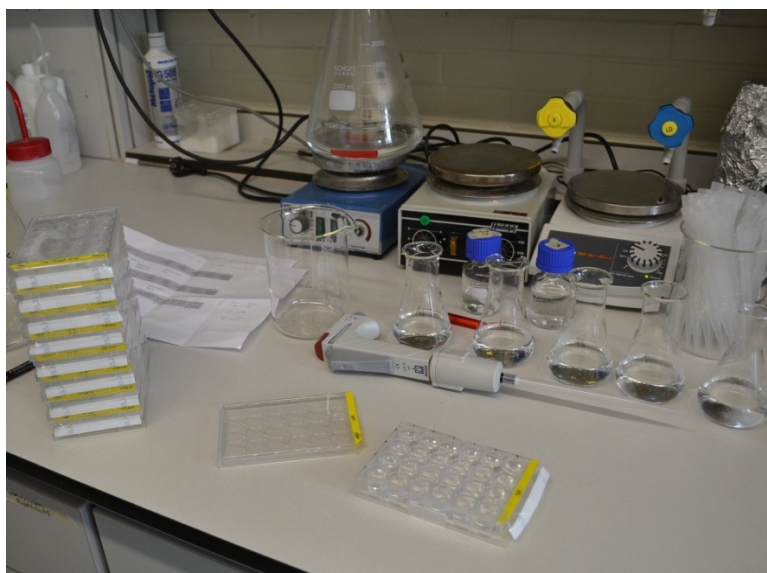
Keu – a kezelt egyedek száma a kezelés utáni adott időpontban,

Koe – a kontroll kezelés egyedeinek száma a kezelés előtt,

Kou – a kontroll kezelés egyedeinek száma a kezelés utáni adott időpontban

Az alkalmazott embrionális tesztet (FET – *Fish Embryo Acute Toxicity Test*) a heidelbergi COS (*Centre for Organismal Studies*) intézetben kifejlesztett módszer alapján végeztük, részben a COS, részben pedig a KÉKI laboratóriumában. A teszt alapjául az OECD 236. sz. szabványa szolgál (OECD No. 236, 2013). A FET során modellállatként zebradániót alkalmaznak, melynek embrionális fejlődésmenete nagyon hasonló a fejlettebb gerincesek embriogeneziséhez, ebből következően ideális modellállata ezen eljárásoknak. A teszt során az újonnan megtermékenyített embriókat a vizsgálandó anyag különböző koncentrációival kezelik, és 24 óránként (96 órán keresztül) inverz mikroszkóp segítségével megállapítják a fejlődési, morfológiai eltéréseket (Weigt et al., 2011). Az *in vitro* eljárás előnye, hogy bizonyos esetekben pótolhatja a lassabb, drágább, körülményesebb kivitelezésű és értékelésű *in vivo* laboratóriumi teszteket, melyeket általában nyulakon és patkányokon végeznek. A zebradániókkal kapcsolatos vizsgálatok meglehetősen nagy szakirodalommal rendelkeznek, fejlődésmenetük igen jól feltárt terület (Laale, 1977; Kimmel et al., 1988, Kimmel et al.,

1995). Az állatok táplálására élő és fagyasztott eleséget (*Artemia salina* – sóféreg, *Culex pipiens* – szúnyoglárva), illetve lemezes haltápot (Sera Vipán[®]) használtunk, a tenyészet fenntartása és a teszt egyaránt 26 ± 1 °C-on, napi 16 órás megvilágítás mellett folyt. A haltenyészet tartására 80 literes akváriumok szolgáltak, melyekből a kísérleti nap előtti délután egy tenyészcsoportot (hím/nőstény arány 2:1) ikráztató akváriumba helyezünk át.



13. ábra. A zebradánió embrionális teszt kivitelezése (fotó: Fejes Ágnes)

A zebradánió ívását a hajnali fény serkenti. Az ikrák lerakása utáni fél órán belül el kell kezdeni azok begyűjtését, mivel a megtermékenyített ikrán belül gyorsan lezajlik az első pár osztódás. Az embriókat 8-16-sejtes állapotban a tesztelni kívánt oldatba helyeztük, a válogatás sztereomikroszkóp alatt történt 8-10-szeres nagyításban (Olympus SZX7, Unicam Magyarország Kft.). A teszt során az újonnan megtermékenyített – esetünkben *Danio rerio* – ikrákat a vizsgálandó anyaggal szemben 96 órás expozíciónak tettük ki. A teszthez 24 lyukú lemezt használtunk (Cellstar[®], Greiner Bio-One), melyben koncentrációnként 20 embriót vizsgáltunk, 4 (lemezen belüli) negatív kontrollal (13. ábra). Emellett beállítottunk egy külső, 20+4 negatív (kezelés nélküli) kontrollcsoportot is. A tesztoldatok hígítására illetve a kezeletlen, negatív kontrollcsoport oldataként meghatározott összetételű sóoldatot (0,294 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,123 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,06 g/l NaHCO_3 ; 0,006 g/l KCl) használtunk (későbbiekben FET-oldat). Pozitív kontrollként egy ismert teratogén anyagot alkalmaztunk 4 mg/l koncentrációban (3,4-diklór-anilin, DCA). Amennyiben a vizsgálni kívánt vegyület nem

oldódik megfelelően a hígításra használt sóoldatban, úgy max. 0,1% dimetil-szulfoxid (DMSO) oldószert alkalmazhatunk az embriók károsítása nélkül. Jelen esetben erre nem volt szükség. Oldószer használata esetén 24 embriót (egy teljes lemezt) az oldószer kontrollcsoportjaként kell beállítani. Naponta felújítottuk az oldatot, pipettával óvatosan távolítva el az embriók mellől, hogy ne okozzunk sérülést. Ezután minden nap megfigyeltük és feljegyeztük a vizsgált paraméterek jelenlétét, melyeket a 3. táblázat tartalmaz. A megfigyelés inverz mikroszkóp alatt, 20-80-szoros nagyításban történt (Olympus IX73 P2F, Unicam Magyarország Kft.). A vizsgált paramétereket a fejlődési szakasznak megfelelően dokumentáltuk (pl. a szívverést 48h elteltével vizsgáljuk). A vizsgálat és oldatcsere kivételével a lemezeket 26 °C-os inkubátorban (IGS 60, Heratherm Inc., Thermo Scientific) tároltuk. Az expozíciós idő végén a letális paraméterek figyelembe vételével, ToxRat[®] program segítségével LC₅₀-értékeket számítottunk. A szubletális paraméterek feljegyzésével *NOEL*, illetve *LOEL* értékeket állapíthatunk meg.

3. táblázat: Az embrionális testben megfigyelt letális és szubletális hatások

Letális hatások	Szubletális hatások
Koaguláció	Gátolt szívverés
Szomiták hiánya	Erősen gátolt szívverés
Farokrégió hiánya, nem megfelelő fejlődése	Spontán mozgás hiánya
Szívverés hiánya	Fejdeformitás
	Szemfejlődés gátlása
	Általános fejlődési zavar
	Általános fejlődési elmaradottság
	Vérkeringés gátlása/hiánya
	Szomiták/farok régió deformitása
	Gerincdeformitás (<i>scoliosis</i> , <i>lordosis</i>)
	Szikhólyagödéma
	Szívburaködéma
	Pigmentáció gátlása, hiánya

A teratogenitási teszttel három kiválasztott anyagot vizsgáltunk: a *glyphosate* hatóanyagot (Lamberti S.p.A), az ezt tartalmazó növényvédőszer-készítményt (Roundup Classic[®], Monsanto Hungária Kft.), illetve a készítmény formázóanyagát (polietoxilált faggyúamin, POEA, Lamberti S.p.A). A teszt során általunk alkalmazott koncentrációk alapjául Richard és munkatársai 2005-ben közölt tanulmányát vettük, melyben a Roundup-készítmény 2%-os

hígítását alkalmazva humán placentasejtvonalakon toxikus hatásokat mértek (Richard et al., 2005). A heidelbergi kutatócsoport előzetes tapasztalatai alapján a zebradánió embriók érzékenysége magasabb, így e koncentrációt mi felső határként alkalmaztuk, és ezt, illetve ennél alacsonyabb értékeket vettünk fel. A *glyphosate* izopropilamin-sója és a POEA adott koncentrációját a Roundup készítményben megtalálható arányhoz viszonyítva számoltuk ki, így a kezdeti 2%-os dózis esetén rendre 9,75 g/l és 3,6 g/l értékűnek adódtak. A további koncentrációkat ennek hígításából számoltuk.

3.2. Cry-toxinok kimutatása és hatásvizsgálatai

3.2.1. Bt-kukoricák termesztése, növényi részek mintavétele

A genetikailag módosított kukoricafajták és közel izogenikus vonalaik termesztését osztályunk dolgozói végezték az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Ökológiai Kísérleti Telepén történt (Budapest Ady-liget, Julianna-major). A talajművelés, trágyázás és címerezés az ökológiai termesztéssel összhangban, az egész területen egységesen történt. Nem alkalmaztunk szintetikus vegyszereket, kizárólag szervestrágyát (Florimo komposztált szarvasmarhatrágya), a gyommentesítés rotációs kapával történt. A területre ajánlott vetési sűrűséget tartva (kb. 70-80 000 tő/ha), vetőgép segítségével (Wintersteiger Dual Disc 4 sorvető gép) vagy szemenkénti vetéssel ültettünk. Az összes fajta vetése május végén történt 0,75 m sor- és 0,20 m tövenkénti távolsággal. A kísérlet jellegétől függően terveztük meg a kísérleti parcellák egymás viszonyított elhelyezkedését. A géntechnológiai úton módosított (GM) kukoricát vetéskor az előírásoknak megfelelően 6-8 sor nem-GM szegélyszávval vetettük körbe (14. ábra).



14. ábra. A Cry3-kukorica kísérleti területéről készült légi felvétel, 20 véletlenszerű blokkal, szegélyszávval körbevéve (fotó: Nagy Z. László)

A kukorica hibridek növényi részeinek mintavétele a későbbi analitikai és biológiai tesztekhez az alábbiak szerint zajlott. A mintavételezés időpontja az R5 (teljes érés) vagy VT-R1 (pollenszórás/hímvirágzás állapot – hólyag állapot) fenológiai stádiumban történt (Ritchie et al., 1992). A levéllemez mintákat (3-5 cm széles szeletekben) a középső régióban vágtuk le. A friss levél mintákat lemértük és műanyag zacskóban azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A pollen minták gyűjtése az optimális pollenszóró stádiumban történt (R1 fenológiai stádium). A címereket délutánonként fehér papír gyűjtőtasakokkal vontuk be (50 cm x 20 cm) majd a tasakokat rögzítettük. Másnap reggel, a pollenszórás után a tasakokat lecseréltük és a pollent begyűjtöttük. A pollent ezután egy héten keresztül, közvetlen napfénytől védve laboratóriumban szárítottuk, majd mintavételi csövekben -20°C-on tároltuk. A tarlómaradványok begyűjtésekor a kukoricán hagytunk leveleket, melyeket elszáradás után távolítottunk, el és használtuk fel a kísérletekhez. A tarlómaradványokból begyűjtött levéltörmelékek a száraz levél felső, elkeskenyedő részéből származnak, mivel a levélnek ez a része a legsérülékenyebb, és a természetben a levéltörmelékek könnyen elérhetik a talaj felszínét, illetve bekerülhetnek a felszíni vizekbe is (Rosi-Marshall et al., 2007).

3.2.2. Kísérlet beállítása a Cry1Ab-, Cry34Ab1- és a Cry35Ab1-toxinok kimutatás- és hatásvizsgálataira

A vizsgálat során két különböző genetikai eseményű, géntechnológiai úton módosított *Bt*-kukoricafajta transzgenikus és közel izogenikus változatát használtuk. A Cry1Ab-toxint termelő *MON 810* transzgenikus kukoricavonalat (a vetőmagot a Monsanto bocsátotta rendelkezésünkre), illetve a *DAS 59122-7* transzgenikus vonalat (a GM-fajta a Pioneer tulajdona), amely Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinokat termel, illetve ezek közel izogenikus párjait. Vizsgálataink során elsődleges szempont volt, hogy a beállított kísérleti rendszer minél jobban reprezentálja a természetes vizes élőhelyeket, ezért a kialakításához felhasznált iszap- és vízmintákat a Velencei-tó sekély parti részéről, illetve a Duna holtág jellegű, a folyóval részleges kapcsolatban álló érdi szakaszáról gyűjtöttük be. A tavaszi időszakban a vízmintákat nagyméretű műanyag kannákba, az iszapmintákat zárható üvegedényekbe gyűjtöttük. A minták begyűjtésekor mind a két területnek legalább 5-5 jellemző pontjáról vettünk víz-, illetve iszapmintát, amelyek elegyítése által az egyes területekre jellemző kevert mintákat képeztünk. Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályán 4-4 db 32 literes akváriumot rendeztünk be a Dunából illetve a Velencei-tóból származó vízzel és iszappal (15. ábra).



15. ábra. Beállított akváriumos kísérleti rendszer a Cry1- és Cry3 -toxinok lebomlásának vizsgálatához (fotó: Fejes Ágnes)

Minden akváriumba kb. 3 cm iszapréteg és 12 l víz került. Az akváriumokban automatikus rendszer biztosította a megfelelő megvilágítást (16 óra világosság – 8 óra sötétség) és levegőztetést (felső ventilláció). A hőmérséklet $25 \pm 2^\circ\text{C}$ volt, a vizek pH értékei 7,4 és 8,6 között változtak. Három héttel a kísérleti rendszer kialakítását követően a szakirodalmi adatok és a vízfelszínhez viszonyított számítások alapján 500 mg száraz kukoricalevél-törmelékkel helyeztünk minden egyes akváriumba. Négy akváriumba *DAS 59122-7*, míg a másik négy akváriumba *MON 810* kukoricalevél-törmelék került. Mintavételi helyenként az első két akváriumba a közel izogenikus, a másik két akváriumba pedig a transzgenikus változat levelének törmeléke került. Ezt követően folyamatosan történt a mintavételezés. A kísérlet 0., 1., 2., 3., és 7. napján történt a víz- és a nedves levélminták begyűjtése az akváriumokból a toxinkoncentrációk változásának vizsgálatához és az ökotoxikológiai tesztekhez. A Duna alig áramló holtágából és a Velencei-tóval részleges összeköttetésben álló nádasos kazettákból származó vízmintákból a mátrixhatások mérésére 100 ml vizet különítettünk el. Az ökotoxikológiai tesztekhez a mintavételi napokon 100-100 mg nedves levéltörmelék mintát gyűjtöttünk Eppendorf-csövekbe, emellett 100 ml vízmintát különítettünk el. Továbbá 50 ml vízmintát vettünk ki minden kukoricalevelet tartalmazó akváriumból, a vízbe beoldódott toxin mennyiségi meghatározásához. Ehhez később a vízmintákat liofilizáltuk, ez alól kivételt képeznek a 48. órában vett vízminták, ugyanis azokat technikai problémák miatt nem sikerült az említett módszerrel tartósítani. A

liofilizálás olyan tartósítási eljárás, amely során a tartósítani kívánt anyag víz-, illetve jégtartalmát szublimációval távolítjuk el (Beke, 2002). Az eljárás lehetővé teszi a mintákban található toxinkoncentráció töményítését, ezzel megkönnyítve a kimutathatóságot.

3.2.3. Kísérlet beállítása a Cry4-toxin kimutató- és hatásvizsgálataira

A kísérlet során a csípőszúnyogok által gyakran választott tenyészhelyekről gyűjtöttünk iszap- és vízmintákat, a kísérlet során ezek körülményeit kívántuk megteremteni. Mintáink három hazai vizes élőhelyről származtak: a Velencei-tó nádasos part menti területéről, Hévízről a tó közeli szúnyogtenészhelyekről és a Körös folyó (Békés) alig áramló holtágas területéről. A mintákat nagyméretű műanyagkannák (50 l) segítségével szállítottuk a laboratóriumba, ahol 48 órán keresztül 4 °C-on tároltuk felhasználásig. A minták egy részét rutin laboratóriumi gyakorlat alapján gázkromatográfiás vizsgálatoknak vetettük alá (GC-MS) a szennyezőanyag-tartalom kimutatóására (Maloschik et al., 2007), és csak a szennyezőktől mentes mintákkal dolgoztunk a későbbiekben. A vízmintákat szűrés és hígítás nélkül használtuk fel. A pH-értékek a minták esetében 7,6 és 8,7 között alakultak. Az ELISA vizsgálat pH-beállítás nélkül vagy a pH 7,6 értékre történő beállításával történt. A begyűjtött iszappal (3-5 cm vastagságban) és vízzel (15 l) rendeztünk be 32 literes akváriumokat, így reprezentálva a szúnyogtenészhelyeket (16. ábra). A teszt során a víz hőmérséklet 25 °C, a megvilágítási idő 16 óra volt. Ahhoz, hogy modellezni tudjuk a földi kezelés során 0,4 kg/ha dózisban alkalmazott *Bti*-készítmény hatását, 6 mg Vectobac WDG (3.000 ITU/mg) granulátumot adtunk a különböző eredetű akváriumvizekbe. Előzetesen a lárvák akut toxicitási tesztet végeztünk WHO szabvány alapján (WHO, 2007), hogy meggyőződjünk a kiindulási koncentrációérték helyességéről. Ennek során 25 db L₄-es stádiumú csípőszúnyoglárvát helyeztünk 100 ml oldatba, melyekbe előzőleg *Bti*-tartalmú készítményeket kevertünk 4 koncentrációban, 4 ismétlésben. Ezek a Vectobac WDG esetében 0,1; 0,2; 0,4 és 0,8 mg/l, míg Vectobac 12 AS esetében 0,25; 0,5; 1 és 2 mg/l értékek voltak. A 95%-os mortalitás ez alapján a granulátum esetében 0,39 mg/l, míg szuszpenzió esetén 1,03 mg/l értékű volt, amely megfelelt a várt értékeknek, így ezekkel a koncentrációkkal dolgoztunk. Az egyes akváriumokba 30 db L₃ stádiumú szúnyoglárvát helyeztünk. A lárvák törmeléket és mikroszkopikus szervezetekeket fogyasztanak a vízben, emellett táplálásukra szójamentes egér- vagy patkánytápot (ssniff[®], Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország) és steril, porított macskatápot (Whiskas[®], Mars Inc., McLean, VA, USA) alkalmaztunk, hogy biztosítsuk a kiegyensúlyozott fejlődést. A mortalitást minden második nap ellenőriztük, a

túlélő lárvákat eltávolítottuk és újabb 30 db L₃ stádiumú szúnyoglárvát helyeztünk az akváriumokba. A mortalitást százalékos értékben (M%) adtuk meg. A Vectobac 12 AS szuszpenzió (1.200 ITU/mg) adagolása hasonló módon történt, az alkalmazott 1,0 kg/ha dózis modellezéséhez 15 mg készítményt adtunk az akváriumba. A mortalitás negatív kontrolljaként egy azonos módon berendezett, 15 l csapvizet tartalmazó akvárium szolgált, melybe szintén szúnyoglárvákat helyeztünk, *Bti*-készítmény azonban nem került a vízbe. A mortalitás mérése párhuzamosan folyt a kontrollakváriumban is. Emellett, a *Bti*-készítmények lebomlását egy 15 l desztillált vizet tartalmazó akváriumban is megfigyeltük, amelyet azonos körülmények közé helyeztünk, és amelybe sem szúnyoglárvák, sem egyéb szerves anyag nem került. Ezt az akváriumot a kísérleti körülmények között detektálható toxin koncentrációjának meghatározásához alkalmaztuk. Háromszor 100 ml vízmintát vettünk az egyes akváriumokból párhuzamosan, először 2 órával a Vectobac készítmények behelyezése után, majd később minden második nap. A vízmintákat fagyasztottuk, liofilizáltuk és -20°C-on tároltuk a mérésig. Az ELISA mérést megelőzően a liofilizált, fagyasztott mintákat 1 ml desztillált vízben oldottuk vissza.



16. ábra. Akváriumos kísérleti rendszer a Cry4-toxin lebomlásának vizsgálatához (fotó:

Debnár János)

3.2.4. Minta-előkészítés és analitikai vizsgálatok a Cry-toxinok hatásának és lebomlásának kimutatására

A Cry-toxinok koncentrációváltozásainak vizsgálatához a vízmintákban, illetve a nedves levélmintákban a toxinok mennyiségét ELISA módszerrel határoztuk meg. A

tarlómaradványokat tartalmazó akváriumokból származó vízmintákban lévő alacsony toxinkoncentráció miatt a meghatározáshoz a mintákat előzetesen fagyasztva szárítással koncentráltuk. A begyűjtött 50 ml térfogatú vízmintákat liofilizáltuk, majd Eppendorf csőben 1 ml extrakciós puffert adagoltunk hozzá. Az így nyert szuszpenziót 1200 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk MLW TH21 típusú centrifugával. A felülúszót leszívtuk, ebből határoztuk meg a toxintartalmat. A mátrixhatás kiküszöbölésére a 0. napos, levéltörmeléket még nem tartalmazó vízmintát is alávetettük a fenti előkészítési eljárásnak, és az abban mért „vak érték”-kel korrigáltunk az értékelés során. A nedves levélmintákat extrakciós pufferrel kezeltük, majd a levelekből a Cry-toxint dörzsöléssel vontuk ki, dörzsmozsárban a levelek és a puffer homogén szuszpenzióját állítottuk elő, amelyet Eppendorf-csövekbe helyeztünk és 10 percig centrifugáltuk 1200 fordulat/perc fordulatszámra MLW TH21 típusú centrifugában. A centrifugálás után a felülúszót pipetta segítségével tiszta Eppendorf-csövekbe helyeztük át. A minták előkészítését követően elkészítettük a megfelelő hígításokat, a vízminták esetében 10x-es, 100x-os hígítások, míg a nedves levelek esetében 100x-os és 1000x-es hígításokat alkalmaztunk. A mintákat és standardokat 100 µl mennyiségben, 2 ismétlésben vittük fel a 96- lyukú mikrotiter lemezre. A továbbiakban a cégek által leírt módszer szerint végeztük a meghatározást.

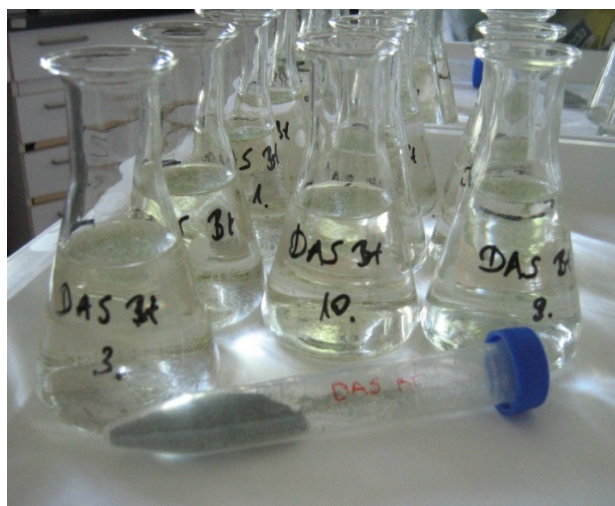
A Cry1Ab-toxin meghatározását az Abraxis cég által forgalmazott Cry1Ab/Cry1Ac Kit-tel végeztük el az általuk kiadott leírás alapján (Abraxis LLC). A minták felvitele után a lemezt 20-30 másodpercen keresztül finom, körkörös mozdulatokkal asztali keverőgép segítségével ráztuk, ezt követően 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a lemez lyukainak tartalmát eltávolítottuk és 1:5 arányban desztillált vízzel hígított mosópufferrel háromszor átmostuk. A mosási szakaszt követően minden lyukba 100 µl Cry1Ab/Cry1Ac antitestoldatot juttattunk. A mikrotiter lemezt ismét 20-30 másodpercig ráztuk és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően újabb mosási szakasz következett az előbb ismertetett mosási folyamatnak megfelelően. Ezután minden lyukba 100 µl enzimkonjugátumot juttattunk pipetta segítségével. A mikrotiter lemezt ismét 20-30 másodpercig finoman ráztuk, majd 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ismét mosási folyamat következett. Ezt követően történt a 100 µl szubsztrátoldat lyukakba pipettázása, majd 20 percig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. A mikrotiter lemezt 20-30 másodpercig ismét finom mozdulatokkal ráztuk asztali keverőgép segítségével. Végül 50 µl stopreagenst adunk minden egyes mintához, ez a lépés sárga színreakciót eredményez, 15 perc elteltével. Az analitikai jel (szín) intenzitását mindkét Cry-toxin

esetében 450 nm hullámhosszon Labsystem iEMS Reader MF típusú mikrotiterlemez-olvasó spektrofotométer használatával határoztuk meg.

A Cry34Ab1- toxin koncentrációjának meghatározása kereskedelmi forgalomban kapható, kvalitatív ELISA Kit segítségével történt (EnviroLogix). Megbízható analitikai standard híján a kereskedelmi fogalomból származó kvalitatív ELISA kit segítségével a Cry34Ab1-toxin lebomlását csak relatív mérték, a kiindulási értékhez képest mutatott csökkenés szerint volt módunk követni. Az ELISA teszt a továbbiakban a szabvány szerint, a Cry1Ab-toxinnál leírtakhoz hasonló módon zajlott.

A természetes vizekből adódó mátrixhatás meghatározásához a Dunából, illetve a Velencei-tóból származó vízmintákat toxinnal mesterségesen szennyeztük (*spike*). 50 ml Duna és Velencei-tó vízmintához, illetve 50 ml desztillált vízhez 50 µl kiindulási levélextraktumot adtunk, tehát a mesterséges szennyezés a kiindulási levélben megtalálható toxin mennyiségével történt. Az elszennyezett mintákból ezt követően desztillált vízzel 10-100-szoros hígításokat készítettünk. A mesterséges szennyezést elvégeztük a liofilizálás előtt és után is, hogy meghatározható legyen a minta-előkészítés hatása a visszanyerhető toxin tartalom kimutatására.

Etetési vizsgálatokba a Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinokat tartalmazó *Bt*-kukoricák különböző növényi részeit (pollen, portok, száraz-és nedves levéltörmelék) vontuk be. E kísérletek során a pollent kiolvasztás után dörzsmozsárral porítottuk, hogy a tesztállatok így elfogadják azt táplálékkul. A leveleket hasonló okok miatt apró darabokra vágtuk. Mivel a *Daphnia magna* szájnnyílása 1-50 µm méretű táplálék befogadására képes, így a levéldarabokat megfelelő lyukméretű szitán szitáltuk át, és ilyen módon kínáltuk fel táplálékkul (17. ábra).



17. ábra. Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinokat tartalmazó kukorica-levéltörmelékkel végzett etetési vizsgálat *D. magna* tesztállaton (fotó: Klátyik Szandra)

A beállított akváriumos teszt során a vízmintákban a Cry4-toxin mennyiségét szintén ELISA módszerrel határoztuk meg. A három akváriumból az első vízmintákat (3x100 ml) két órával a szúnyoglárva és a Cry4-toxintartalmú készítmények beszórása után vettük, majd ezután a további mintavételek 2 naponta következtek. A mintákat lefagyasztottuk, majd szárazra liofilizáltuk és a mérés előtt desztillált vízben oldottuk vissza. A mintákat a mérésig -20 °C-on mélyhűtőben tároltuk.

A meghatározást 96-lyukú mikrotiter lemezen (Nunc #442404, Roskilde, Dánia) végeztük a „szendvics” ELISA elvi felépítése szerint (Tijssen, 1985). A mikrotiter lemez lyukainak falára Cry4-specifikus antitesteket kötöttünk, a szérum 1:100 – 1:625 hígítású, 0,1 M karbonát pufferben (pH 9,6) felvett oldatának (100 µl/lyuk) 4 °C-on, 12 órán át történő inkubálásával. 0,2% Tween 20 detergenst tartalmazó foszfátpufferrel (PBST, pH 7,4) történő mosást (4 x 250 µl/lyuk) követően, a fennmaradt kötőhelyeket foszfátpufferben (PBS, pH 7,4) készült 1% zselatinoldat (150 µl/lyuk) 38 °C-on, 1 órán át történő inkubálásával blokkoltuk. Mosást (PBST, pH 7,4; 4 x 250 µl/lyuk) követően standard Cry4-toxinoldatot vagy a mintákat pipettáztuk a lyukakba (50 µl/lyuk), majd a lemezeket 38 °C-on, 1 órán át inkubáltuk. Újabb mosást (PBST, pH 7,4; 4 x 250 µl/lyuk) követően az antiszérum torma peroxidáz enzimmel készített konjugátumának 1:50 – 1:30,000 hígítású PBST-oldatát (50 µl/lyuk) pipettáztuk a lyukakba, majd a lemezeket 38 °C-on, 1 órán át inkubáltuk. Ezt követően, végső mosási lépés (PBST, pH 7,4; 4 x 250 µl/lyuk) után 1,2 mM koncentrációjú

hidrogén-peroxidot (H_2O_2) és 3 mM 1,2-fenilén-diamint (OPD) tartalmazó 200 mM kálium-dihidrogén-citrát puffert (pH 3,8) (200 μl /lyuk) pipettáztuk a lyukakba, majd a színreakció bekövetkezte (10-60 perc) után az enzimreakciót 4 N kénsavoldat (H_2SO_4) (50 μl /lyuk) adagolásával leállítottuk. A színjelet végpontos mérésben 492 nm hullámhosszon mértük iEMS mikrotiterlemez-olvasó spektrométerben (LabSystems, Helsinki, Finnország). Az analitikai meghatározáshoz a standard görbéket a négyparaméteres (szigmoid) egyenlet alapján vettük fel. Ezt a technikát leginkább tendenciák vizsgálatára, illetve összehasonlításra érdemes használni. Mivel mi ökológiai rendszereken belüli folyamatot kívántunk vizsgálni és összehasonlítani, a magunk számára alkalmasnak ítéltük ezt a módszert.

3.2.5. Biológiai teszt módszerek a Cry-toxinok káros hatásainak vizsgálatához

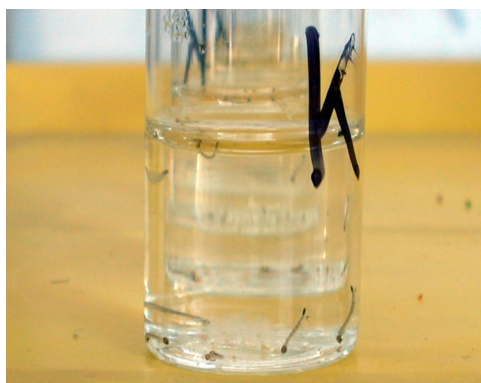
A Cry1Ab-, Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinok hatásának detektálásához *Daphnia magna* és *Aedes aegypti* tesztállaton végeztünk akut, illetve krónikus, etetési teszteket.

A *Daphnia magna* akut immobilizációs teszt során (lásd 4.1.3. fejezet) a tarlómaradványokat tartalmazó akváriumok vizéből vett mintákkal olyan módon jártunk el, mint a növényvédő szerrel szennyezett vízminták esetében. Ennek során a transzgenikus kukoricalevél-törmelékéből a vízbe esetlegesen kioldódott toxinok hatásaira voltunk kíváncsiak. A krónikus, 21 napos *Daphnia magna* reprodukciós teszt a toxintartalmú levéltörmelékkel való történő etetés mellékhatásait vizsgálta. A kísérletet a MSZ ISO 10706 szabvány módosításával végeztük (OECD Test No.211, 2012). Esetünkben nem a tesztállatok közegébe oldottuk a szennyező anyagot, hanem az az etetés során került a szervezetükbe. A teszthez 6-24 órás fiatal állatokat használtunk. 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba 60 ml *Daphnia*-tenyésztoldatot töltöttünk, majd ezt követően minden lombikba véletlenszerűen 1 db vízibolhát helyeztünk. 10 ismétlésben végeztük el a vizsgálatot. A tesztorganizmusok ez esetben táplálék útján kerültek kapcsolatba a vizsgált anyaggal. A kontroll csoport *ad libitum* táplálása algával történt (*Pseudokirchneriella subcapitata*), míg a kezelt csoportok etetéséhez a különböző kukoricaváltozatok leveléből előállított, leszitált kb. 4-5 mg levélörleményt használtuk. Az etetésre 3 naponta került sor, a tesztközeget hetente kicseréltük. A vizsgálat során 3 naponta feljegyeztük az anyák mortalitását, illetve a született fiatal egyedek számát. A fiatal egyedeket a számlálást követően minden esetben eltávolítottuk az anyák mellől. A kezelések hatásának meghatározásához egytényezős varianciaanalízist (egyutas ANOVA) végeztünk 5%-os szignifikanciaszinten, mely során a mortalitást a vizsgálat három különböző napján (12., 16. és 21. nap) hasonlítottuk össze, illetve a kapott eredményeket a Kaplan-

Meier-elemzés (túlélési görbe meghatározására szolgáló analízis) elvégzésével a vizsgálat teljes idejére vonatkoztatva is kiértékeljük.

Az *Aedes aegypti* tenyészet fenntartása 26-28°C-on és napi 16 órás megvilágítás mellett, erre a célra kifejlesztett hálós ketrecekben történt. A nőtények vért szívnak, ezért etetésük során fehér egereket helyeztünk el a ketrecekben. A nőtények csak vérszívást követően képesek termékeny tojásokat lerakni (Womack, 1993). A hímek a természetben növényi nedveket fogyasztanak, ezért cukoroldatba áztatott vattát biztosítottunk a számukra. A szaporítás során a ketrecekben található vizes tálkákba szűrőpapírhengereket helyeztünk el, amelyekre a nőtények le tudták rakni a tojásaikat. A hengereket ezt követően eltávolítottuk, majd 24 órán keresztül szárítottuk, amelyre azért volt szükség, hogy az embrionális fejlődés befejeződhessen. A kiszáritott hengereket ezután olyan zárt üvegedénybe tettük, amelybe előzetesen, főzőpohárban telített sóoldatot helyeztünk el, így biztosítva a megfelelő páratartalmat a tojások számára. A teszt során a csípőszúnyoglárvékat klórmentes csapvízben tartottuk, és száraz, őrölt szójamentes rágsálós táppal (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) etettük. A lárvák kedvező körülmények között 7-9 nap alatt bábbá, majd további 2 nap elteltével imágóvá fejlődtek (Womack, 1993). A csípőszúnyoglárvaon elvégzett etetési tesztet a WHO (WHO, 2007) ajánlás alapján végeztük el, viszont egyes részletekben eltértünk az ajánlásban leírtaktól. A teszt során a lárvák az L₃-as stádiumban voltak. A felhasznált tenyészet az Országos Epidemiológiai Központból származik. A szúnyoglárva természetes élőhelyükön, az aljzaton megtalálható szerves törmelékekkel és mikroszkopikus élőlényekkel táplálkoznak, szájszervükkel kisebb, fogyasztható darabokat távolítanak el a nagyobb méretű táplálékokból. A teszt során üvegből készült *faeces*-poharakba helyeztük el a vizsgált vízmintát, a vizsgált nedves levélmintát és a véletlenszerűen kiválasztott egyedeket (18. ábra). A WHO ajánlástól eltérően tesztközegeként nem csapvizet vagy mesterségesen előállított vizet használtunk fel, hanem az akváriumokból származó vízmintákat, illetve etető anyagként nem Cry-toxintartalmú szuszpenziót, hanem az akváriumokból származó nedves levéltörmeléket használtunk. A levéltörmelék vízben oldódó komponensei a lárvák kültakaróján keresztül felszívódva fejthetik ki hatásukat, míg a vízben nem oldódó összetevőkkel a lárvák a szerves törmelék elfogyasztása során (*per os*) során kerülnek kapcsolatba (Zöldi et al., 2005). Minden edénybe 10 db L₃ stádiumú csípőszúnyoglárvét, 10 ml vízmintát és nedves levéltörmeléket helyeztünk. Az összes vízminta esetében a vizsgálatot 4 ismétlésben végeztük el. A két kukoricavonal egyike transzgenikus változatainak leveleit tartalmazó akváriumokból származó vízminták illetve nedves levélminták toxicitását a közel izogenikus változatokat tartalmazó akváriumokból származó vízminták és nedves

levélminták toxicitásához hasonlítottuk, tehát kontrollcsoportnak a közel izogenikus változatok vízmintáit és nedves levélmintáit tekintettük. A teszteket a kontrollegyedek legalább 50%-ának imágóvá fejlődéséig végeztük, feljegyezve a mortalitást és a fejlődési stádiumokat. A levéltörmelékes kísérlettel megegyező módon végeztük el az etetési vizsgálatot pollennel, illetve portokfal-örleménnyel is.



18. ábra. Etetési vizsgálat csípőszúnyog lárvákon (fotó: Fekete Gábor)

A Cry4 toxin lebomlásának vizsgálatánál a 3.2.3 pontban leírtak alapján végeztük el a mortalitási tesztet *Aedes aegypti* fajon.

4. Eredmények

4.1. Ipari és mezőgazdasági eredetű szennyezések kimutatás- és hatásvizsgálatainak eredményei

4.1.1. Az analitikai vizsgálatok eredményei

A monitorozási vizsgálatok során begyűjtött víz- és talajmintákban azonosított szennyezések többféle szerves mikroszennyezőt (növényvédő szerek, klórozott szénhidrogének stb.) és mikroelemeket tartalmaztak.

A kutatás során 423 darab talajmintát vizsgáltunk, melyből 77 minta tartalmazott kimutatható szennyezést egy vagy több célvegyületre nézve, a szennyezési ráta 17-30% volt. A 202 darab vizsgált vízmintából 76 db tartalmazott szennyezést (szennyezési ráta 18-67%). Leggyakoribb talajszennyezők a találati gyakoriság alapján az *atrazine* (10-580 ng/g), a *trifluralin* (3-200 ng/g), az *acetochlor/metolachlor* (5-80 ng/g), a *DDT* és bomlásterméke, a *DDE* (38-460 ng/g), illetve a *lindane* és bomlásterméke, valamint a *HCH* (7-103 ng/g). A leggyakoribb vízszennyezők közé az *acetochlor* (0,02-3900 µg/l), az *atrazine* (0,5-100 µg/l), a *metolachlor* (0,001-56 µg/l), a *trifluralin* (0,8-9 µg/l) és a *diazinon* (0,001-0,85 µg/l) sorolható.

A 322 talajmintának 18%-a volt mikroelemekkel szennyezett. Mezőgazdasági területről származó mintákban főként nikkelt, arzént és báriumot mutattak ki. Közülük mindhárom toxikus lehet, ám a bárium oldhatatlansága és viszonylagos ritkasága miatt kevésbé veszélyes. A nikkelszennyezés a talaj mélységével és szerkezetével korrelációt mutatott. Ipari területekről származó minták főként nikkelt, arzént, báriumot és szelént tartalmaztak. 85 vízmintából 45 esetben detektáltunk szennyezettséget, főként talajfuratokban és talajvíz-monitorozó mintavételi helyeken, míg 9 esetben felszíni vizek közelében (öntözőcsatorna) vett mintákban. A mezőgazdasági területekről gyűjtött mintákban főként bór-, szelén- és rézszennyezés volt kimutatható. Várható módon az ipari területek közeléből érkező minták esetén tapasztaltunk magasabb szennyezettséget, az innen gyűjtött minták 74%-ában mutattunk ki valamilyen szennyezőanyagot. A mezőgazdasági területek mintáihoz viszonyítva itt nem a bór-, szelén- és rézszennyezés dominált, hanem főként arzént és krómot mutattak ki.

84 vizsgált talaj- és felszíni vízmintából 21 esetben mutattunk ki *glyphosate* gyomirtószer-szennyezést, ami 25%-os szennyezettségi rátának felelt meg. A vízminták esetében a kimutatási határ $0,12 \pm 0,10$ ng/ml értékűnek adódott. E hatóanyag esetében az

ELISA módszerrel detektált vízszennyező koncentráció 0,54 és 0,98 ng/ml között tartományban volt. A szert kiemelkedően magas koncentrációban (1 ng/ml-hez közeli értékben) 5 alkalommal, míg magas koncentrációban (0,54-0,76 ng/ml) 16 esetben mutattuk ki. Miután a keresztreaktivitás a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit esetében a *glyphosate* fő metabolitjára (AMPA) alacsonynak mondható (0,0002%), így az eljárás a fő komponens kimutatására alkalmas (Mörtl et al., 2013).

4. táblázat: *Glyphosate* hatóanyag koncentrációja a pozitív vízmintákban

Mintavételi hely / Művelés típusa	<i>Glyphosate</i> -koncentráció (ng/ml)
Battonya / ökológiai	0,68 ± 0,09
Battonya / legelő	0,66 ± 0,15
Battonya / legelő	0,63 ± 0,07
Csorvás / intenzív mg.	0,65 ± 0,13
Csorvás / intenzív mg.	0,82 ± 0,04
Csorvás / intenzív mg.	0,68 ± 0,2
Köröstarcsa / ökológiai	0,76 ± 0,04
Medgyesegyháza / ökológiai	0,75 0,08
Békéscsaba / ipari	0,93 ± 0,08
Békéscsaba / ipari	0,60 ± 0,05
Békéscsaba / ipari	0,66 ± 0,10
Gyomaendrőd / ipari	0,98 ± 0,003
Gyomaendrőd / ipari	0,56 ± 0,26
Gyomaendrőd / ipari	0,63 ± 0,04
Gyomaendrőd / ipari	0,59 ± 0,05
Gyomaendrőd / ipari	0,59 ± 0,11
Gyomaendrőd / ipari	0,87 ± 0,08
Orosháza / közútkezelő	0,66 ± 0,04
Orosháza / közútkezelő	0,96 ± 0,10
Orosháza / közútkezelő	0,58 ± 0,06
Orosháza / közútkezelő	0,54 ± 0,003

4.1.2. Biológiai vizsgálatok eredményei

A monitorozás során az analitikai vizsgálatok eredményei alapján kiválasztott mintákat vontuk be a toxicitási tesztekbe. A főként az orosházai közútkezelő és üveggyár környékéről beérkező minták zöme nagyfokú olajos szennyezettséget mutatott. Ezeket nem vizsgáltuk biológiai módszerekkel, hiszen a tömény olajban az állatok nem éltek volna túl. A detektált szennyezőanyag-tartalom alapján, a vártak megfelelően, a vizsgált vízminták túlnyomó többsége nem okozott immobilizációt a *Daphnia magna* tesztállaton végzett tesztben. Ezzel szemben azoknál a vízmintáknál, ahol magas növényvédő-szermaradék és/vagy toxikus mikroelem-tartalom volt detektálható (pl. V1G1, V1E1), szignifikáns vagy kiugró toxicitást tapasztaltunk a tesztállatokon. A könnyebb áttekinthetőség érdekében két táblázatban foglaltam össze a *D. magnán* mortalitást okozó környezeti minták származási helyeit (5. táblázat), illetve a releváns analitikai eredményeket és a leggyakrabban előforduló mikroelemtartalmat a víziből mért toxicitási értékekkel (6. táblázat).

A vizsgálatokba bevont minták kiválasztásának alapja az előforduló, határérték felett mért szennyezőanyag-koncentráció és/vagy a víziből mért LC₅₀-értékkel összevethető mennyiségű szennyezés volt. Szignifikáns toxicitást főként a rovarirtó szerekkel szennyezett felszíni vízminták, illetve talajoldatok esetében vártunk.

A mintáinkban leggyakrabban előforduló mikroelemek (arzén, bór, nikkel, szelén) kis toxicitásúnak bizonyultak *D. magnán*. Számos mintában dibutil-ftalát vegyületet detektáltunk, amely ismert lágyító szer, gyakori vízszennyező anyag (Fromme et al., 2002). Több esetben (pl. V4A1, V5D1) 100 ng/ml szintet meghaladó koncentrációban volt jelen, azonban még ebben a koncentrációban sem tapasztaltunk kiemelkedő mortalitást víziből, az irodalmi adatoknak megfelelően (LC₅₀ = 3,0-5,2 mg/l) (Staples et al., 1997). Számos minta a felszíni vizekre meghatározott határértékek feletti koncentrációban tartalmazott szennyező elemeket (pl. V4A1, V6A0), azonban ezek nem okoztak mortalitást tesztállatainkon. A V1E1 és a V1G1 minták, melyek erősen szennyezettek voltak *acetochlor* és *atrazine* hatóanyagokkal, emellett magas bór- és szelénkoncentrációt (V1E1 minta esetében mindkettő, V1G1 mintánál a szelén határértéken felüli), emellett V1G1 minta határérték-közeli arzénszennyezést tartalmaztak. Mindkét minta hígítatlanul 100%-os mortalitást okozott *D. magnán*. Ezután 5-, 10-, és 25-szörös hígítást alkalmaztunk, és az eredmények alapján megállapítottuk az 50%-os mortalitáshoz tartozó koncentrációt, ami 6,4 (4,3-8,9), illetve 13,3 (9,0-18,8) -szoros hígítást jelentett. A V1D1 vízminta esetében 65±8,7%-os mortalitást tapasztaltunk kevés *diazinon*-, *acetochlor*- és *metolachlor*-szennyezettség mellett,

ahol a *metolachlor* koncentrációja nem éri el a vízibolhára vonatkoztatott LC_{50} -értékének 1%-át sem, azonban ezek mellett a mintában a szennyezési határérték alatti réztartalmat mutattunk ki (7,2 $\mu\text{g/l}$). A V2F1 minta esetében, amelynél a toxikus hatóanyag-tartalom alapján szignifikáns hatást vártunk, nem tapasztaltunk kiemelkedő mortalitást. E minta esetében ez különösen meglepő volt, mivel az itt mért *diazinon*- és rézkoncentráció nagyon közel esik az irodalmi LC_{50} -értékhez, így bizonyos mortalitást kellett volna tapasztalnunk. Ahhoz, hogy a saját vízibolha-tenyészetünk érzékenységét össze tudjuk mérni az irodalmi adatokkal, a tiszta *diazinon* hatóanyagra vonatkoztatva is elvégeztük a mortalitási tesztet, mely során LC_{50} -értéknek 0,34 (0,27-0,39) $\mu\text{g/l}$ -t kaptunk. Ezt követően *diazinont* adtunk a vízmintához, az LC_{50} -értéknek megfelelő koncentrációban (mesterségesen szennyeztük), így a várható eredmény teljes mortalitás lett volna. Azonban az így létrehozott mintában okozott mortalitás nem érte el ezt a mértéket, így valószínűsíthetően valamely anyag gátolhatta a *diazinon* hatáskifejtését. Egy másik vízminta esetében (V3A0) magas, szennyezettségi határértéket jóval meghaladó bór- és a *Daphniára* vonatkozó LC_{50} -értéknél magasabb rézkoncentráció mellett $40 \pm 28,3\%$ -os mortalitást tapasztaltunk *D. magna* tesztállaton. Ekkor a korábbi esethez hasonlóan mesterséges szennyezést végeztünk 0,34 $\mu\text{g/l}$ koncentrációjú *diazinon*-oldattal, ekkor 100%-os mortalitást detektáltunk.

A talajminták közül a T1E3 mintában különböző peszticid- és mikroelemszennyezést detektáltunk, a nikkeltartalom 40,1 mg/kg értékűnek adódott, amely szennyezettségi határértéken felüli koncentrációt jelent. Emellett 24,6 mg/kg mennyiségben réz volt kimutatható, mely jóval a *Daphniára* vonatkozó LC_{50} -érték felett van. Az immobilizációs vizsgálathoz a mintából talajoldatot készítettünk, amely $94,9 \pm 8,8\%$ -os mortalitást okozott tesztállatainkon. A T3A0 kódú talajminta egyéb szennyezők mellett magas arzéntartalommal rendelkezett, emellett az 50%-os mortalitási értéket kiváltó koncentrációt többszörösen meghaladó mennyiségű rezeset tartalmazott (31,6 mg kg^{-1}). A toxicitási teszten 100%-os immobilizációt figyeltünk meg, a hígítási sorok tesztelése után az LC_{50} -értéket 2,54 (1,7-3,3) -szeres hígításnál tudtuk meghatározni.

5. táblázat: A *Daphnia magnán* mortalitást okozó környezeti minták származási helyei

Mintakód	Település	Terület típusa	Művelés típusa	Fő szennyező*
V1D1	Gyomaendrőd	ipari	-	Cu
V1E1	Gyomaendrőd	ipari	-	<i>acetochlor</i> , B, Cu, Se,
V1F1	Gyomaendrőd	ipari	-	As
V1G1	Gyomaendrőd	ipari	-	<i>acetochlor</i> , Cu, Se
V2F1	Medgyesegyháza	mezőgazd.	ökológiai	<i>diazinon</i>
V3A0	Csorvás	mezőgazd.	intenzív	B, Cu
V5D1	Battonya	mezőgazd.	legelő	Se
V6A0	Békéscsaba	szennyvíztelep	-	As
T1E3	Gyomaendrőd	ipari	-	Cu, Ni
T3A0	Köröstarcsa	mezőgazd	ökológiai	As, Cu

* Szennyezettségi határértéket és/vagy a *Daphnia magna*-ra vonatkozó LC₅₀-koncentrációt meghaladó mennyiség (*European Parliament and Council*, 2006)

6. táblázat: A vizsgált minták szennyező anyagai és mortalitása *D. magna* tesztállaton.

Minták v-víz t-talaj	Növényvédőszer-szennyezés ($\mu\text{g/l}$ vagy mg kg^{-1})							Leggyakoribb szennyezőelem-tartalom ($\mu\text{g/l}$ vagy mg kg^{-1})				Mortalitás <i>D. magna</i> tesztállaton
	<i>acetochlor</i>	<i>atrazine</i>	<i>diazinon</i>	<i>metolachlor</i>	<i>terbutryn</i>	<i>trifluralin</i>	<i>glyphosate</i>	As	B	Ni	Se	
V1D1	0,18±0,04	-	0,008±0,001	55,9±4,9	-	-	-	8,0	145	5,0	-	+
V1E1	> 1000	~ 100	< 0,001	1,66±0,22	0,18±0,03	0,8±0,1	-	-	609*	6,0	12,6*	+++
V1F1	35,9±3,68	1,0±0,008	0,011±0,003	0,039±0,007	-	-	-	40,5*	69,5	-	-	-
V1G1	> 1000	> 100	< 0,001	0,56±0,13	0,35±0,07	9,0±1,2	-	9,6	360	15,9	23,2*	+++
V2F1	-	-	0,84±0,008	-	-	-	0,75±0,08	1,8	367	2,5	-	-
V2F1 ^a	-	-	1,18±0,05 ^b	-	-	-	0,75±0,08	1,8	367	2,5	-	-
V3A0	-	-	< 0,001	-	-	-	-	-	1544*	0,9	-	+
V3A0 ^a	-	-	0,34±0,01 ^b	-	-	-	-	-	1544*	0,9	-	+++
V4A0	-	-	-	0,004±0,001	-	-	-	2,0	121	3,0	-	-
V4A1	-	-	-	-	-	-	-	-	846*	-	-	-
V5A0	-	-	-	< 0,001	-	-	-	2,6	111	5,0	-	-
V5A1	-	-	-	-	-	-	-	-	183	-	5,3	-
V5D1	-	-	-	-	-	-	-	-	152	-	3,7	-
V6A0	-	-	-	-	-	-	-	12,9*	127	2,6	-	-
V6B1	1,54±0,28	0,50±0,11	-	0,044±0,005	-	-	0,60±0,05	-	700*	2,0	-	-
V7F1	0,26±0,005	-	0,012±0,004	-	-	-	-	-	816*	2,7	-	-
T1A2	0,014±0,002	-	-	-	-	-	-	10,8	22,6	35,4	-	-
T1D3	0,011±0,002	-	-	0,019±0,004	-	-	0,56±0,26	16,6*	49,2	53,1	-	-
T1E3	0,005±0,001	0,20±0,04	-	0,011±0,002	-	0,011±0,01	-	7,81	22,7	40,1*	-	++
T2A1	-	-	-	0,081±0,008	-	-	-	16,3*	40,5	51,2*	-	-
T3A0	-	-	-	-	-	0,20±0,03	-	15,4*	30,8	37,1	0,742	+++
<i>D. magna</i> LC ₅₀	9000 ^c	87000 ^c	0,96 ^c	25000 ^c	2660 ^c	250 ^c	780000 ^c	7500- 15040 ^d	56000- 141000 ^f	7300 ^g	430-4070 ^h	

a) Hozzáadott LC₅₀-értéknek megfelelő mennyiségű *diazinon* **b)** Mért és hozzáadott *diazinon* mennyiség összege **c)** irodalmi adat (Tomlin, 2000) **d)** As(III), As₂O₃-ként mérve (Lilius et al., 1995, Guilhermino et al., 2000) **f)** 141000 $\mu\text{g/l}$ B(III), tetraborát (Maier és Knight, 1991), ill. 56000-66000 $\mu\text{g/l}$, elemi B esetén (Strigul et al., 2009) **g)** Ni(I), NiCl₂-ként mérve (Pedersen és Petersen 1996, Ferreira et al., 2010) **h)** 430-3000 $\mu\text{g/l}$ Se (IV) és 550-5300 $\mu\text{g/l}$ Se (VI) esetén (Martins et al., 2007) * Határértéken felüli koncentráció (6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet)

A minták *glyphosate*-tartalma nem okozott mortalitást *D. magnán*, ami összefüggésben van az irodalmi adatokkal, ahol az LC_{50} -értéke 780 mg/l (Tomlin, 2000). A *glyphosate* aktív hatóanyag irodalmi LC_{50} -értéke tág határok között mozog, gyakran laboratóriumi kolóniák is eltérő érzékenységet mutatnak (Cuhra et al., 2013). Saját tesztállataink tűrőképességét *glyphosate* izopropil-amin-sójára két eltérő populációban határoztuk meg: az egyik csoport saját laboratóriumi tenyészetünk, a másik pedig Pest megye (Soroksár) tavaszi, nyári kisvízeiből begyűjtött vad típusú tenyészet harmadik laboratóriumi generációja volt. Előzetesen mindkét csoport esetében elvégeztük az érzékenységi vizsgálatot, melynek során az újonnan begyűjtött kolónia érzékenyebbnek bizonyult a standard laboratóriumi tenyészetünknél ($K_2Cr_2O_7$ LC_{50} -értékek rendre 1,17 illetve 2,06 mg/l értékűnek adódtak). Standard laboratóriumi tenyészetünk 48 órás LC_{50} értéke *glyphosate* hatóanyagra 750-1080 $mg\ l^{-1}$, amely jó összhangban van az irodalmi adatokkal. A begyűjtött tenyészet hozzávetőleg kétszer nagyobb érzékenységet mutatott a hatóanyag iránt, 100-480 mg/l koncentrációk közé esett a mért LC_{50} -értéke. A *glyphosate* hatóanyag esetében megvizsgáltuk annak egyik gyakran alkalmazott készítményét, a Roundup Classic-ot is (Monsanto). A Roundup készítmények biztonsági adatlapjain *Daphnia magnára* megadott LC_{50} -értékei 11-37 mg/l között vannak feltüntetve. A standard laboratóriumi tenyészetünk ezzel összhangban 20,6, míg a vad típusú tenyészet 18,7 mg/l LC_{50} -értéket mutatott. A POEA esetében az irodalmi adatok LC_{50} -re 0,1-0,9 mg/l körüli koncentrációkat tüntetnek fel, az etoxiláltsági fok függvényben (Brausch et al., 2007). Az általunk végzett tesztben a POEA 3,1 mg/l koncentrációban nem mutatott szignifikáns mortalitást a standard *D. magnán*, azaz jóval kevésbé volt érzékeny, mint azt az irodalmi adatok alapján vártuk (Brausch et al., 2007). A begyűjtött, vad típusú vízbolhák ebben az esetben is érzékenyebbnek bizonyultak, már 1,45 mg/l POEA koncentrációban elpusztult a tesztállatok fele (7. táblázat).

7. táblázat: A *glyphosate*, POEA és Roundup akut LC₅₀-értékei *D. magna* és *D. rerio* tesztállaton

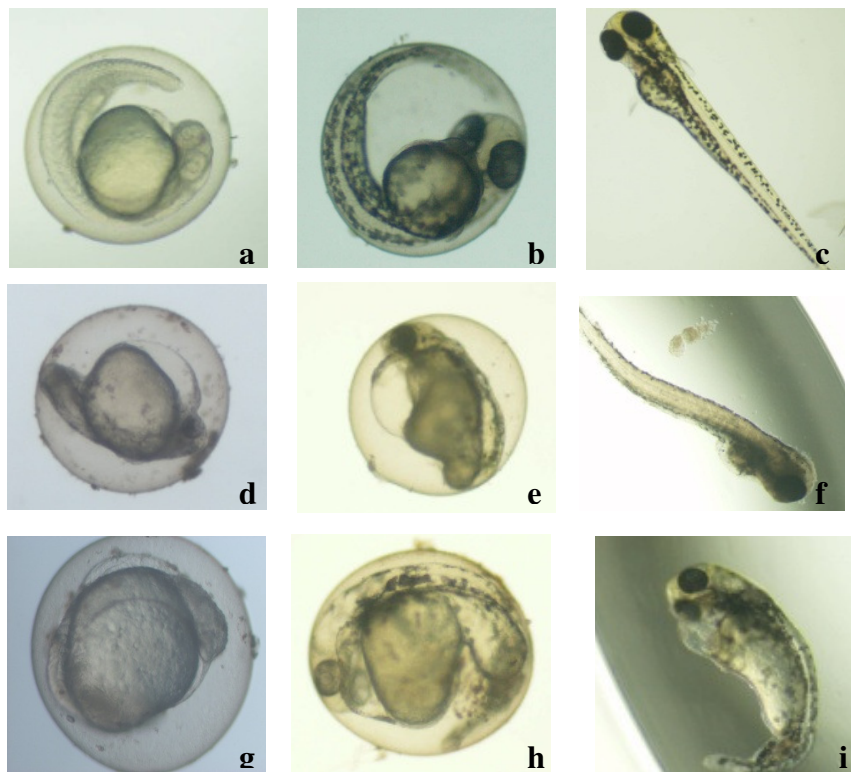
Összetevő	LC ₅₀ (mg/l) [konfidenciaintervallum]	
	<i>D. magna</i>	<i>D. rerio</i>
<i>glyphosate</i>	900 [750 – 1080] ^a 360 [100-480] ^b	> 9750
POEA	3,3 [3,1-5,1] ^a 1,28 [0,8-1,8] ^b	5 [4,5-5,4]
Roundup	20,6 [17,8-30,6] ^a 18,7 [15,3-33,6] ^b	90 [78-147]

^a standard populáció (szabvány szerinti),

^b laboratóriumban szelektált vad típus (begyűjtött vad törzs)

E három anyagot – a *glyphosate* hatóanyagot, az ezt tartalmazó növényvédőszer-készítményt (Roundup Classic®), illetve a készítmény formázóanyagát (polietoxilált faggyúamin, POEA) – embrionális haltestben is vizsgáltuk, hogy az esetleges teratogén hatásukat felderítsük. Az LC₅₀-értékek ennél a tesztípusnál is hasonlóan alakultak: legtoxikusabbnak a formázóanyag (POEA) bizonyult (5 mg/l), ezt követte a formázott készítmény 90 mg/l értékkel. A *glyphosate* aktív hatóanyag a legmagasabb, általunk mért koncentrációban (9750 mg/l) sem váltotta ki a tesztállatok 50%-ának pusztulását (7. táblázat). A POEA formázóanyag és a Roundup magas (20, illetve 100 mg/l feletti) dózisa szinte azonnali koagulációt váltottak ki az embrióknál. Szubletális dózisban számos teratogén hatás volt megfigyelhető, legnagyobb számban a fejet érintő deformitások, a szívverés és a vérkeringés gátlása, a pigmentáció hiánya és ödémák (szívburok- és szikhólyagödémák) voltak megfigyelhetők. A POEA esetében detektáltuk a legnagyobb számú deformitást az LC₅₀-koncentrációhoz közeli dózisok esetében. Sok esetben a teszt egyes napjain megfigyelt

tünetek ugyan nem voltak letálisak, a későbbiekben azonban elpusztították az állatot. A legjellemzőbb fejlődési stádiumok és a deformitások láthatóak a 19. ábrán.



19. ábra. Zebradánio fejlődési fázisai a 24., 48. és 72. megtermékenyítés utáni órában (*post-fertilization hours* – Hp) a kezeletlen és a kezelt csoportokban, 40x nagyításban: a–c./ kezeletlen csoport; d./ 5,76 mg/l POEA (48 Hp); e./ 4 mg/l DCA (72 Hp); f) 5,47 mg/l POEA (72 Hp); g./ 5,76 mg/l POEA (24 Hp); h./ 5,47 mg/l POEA (72 Hp); i./ 5,47 mg/l POEA (72 Hp). (fotó: Fejes Ágnes)

4.2. Cry-toxinok kimutatás- és hatásvizsgálatainak eredményei

4.2.1. A Cry1Ab1- illetve a Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinokkal végzett vizsgálatok eredményei

A kísérlet első felében – az Anyagok és módszerek fejezet 3.2.2. pontjában leírtak alapján – a berendezett Velencei-tóból illetve Dunából származó víz- és iszapmintákat tartalmazó akváriumokba Cry1- illetve Cry3-toxinokat tartalmazó, elszáradt kukoricalevél-törmeléket

helyeztünk. Ezt követően meghatározott időközönként levél- illetve vízmintákat vettünk, hogy a toxintartalom időbeli csökkenését analitikai (ELISA) és akut toxicitási vizsgálatokkal (*Daphnia magna*, *Aedes aegypti* tesztek) detektálhassuk. A *MON 810* és *DAS 59122-7* kukoricák transzgenikus és közel izogenikus változatainak levélmintáiban az akváriumokba helyezés előtt meghatároztuk a kiindulási Cry-toxintartalmat. Megbízható analitikai standard híján a kereskedelmi fogalomból származó kvalitatív ELISA kit segítségével a Cry34Ab1-toxin lebomlását csak relatív mérték, a kiindulási értékhez képest mutatott csökkenés szerint volt módunk követni. A kiindulási koncentráció ismeretében a levélből vízbe kijutó, illetve a vízben megtalálható toxin mennyisége meghatározható. Az izogenikus vonalakban, a vártaknak megfelelően egyik kukorica esetében sem volt kimutatható a keresett Cry-toxin jelenléte. A *MON 810* transzgenikus változatainak esetében a toxintartalom mért koncentrációja 4986 ng/g. A mérés során az összes vízminta toxintartalma a kukoricavonalak transzgenikus és a közel izogenikus változatainak esetében is a kimutatási határ alatt volt, mely Cry1Ab-toxinra 0,20 ng/ml értékű volt.

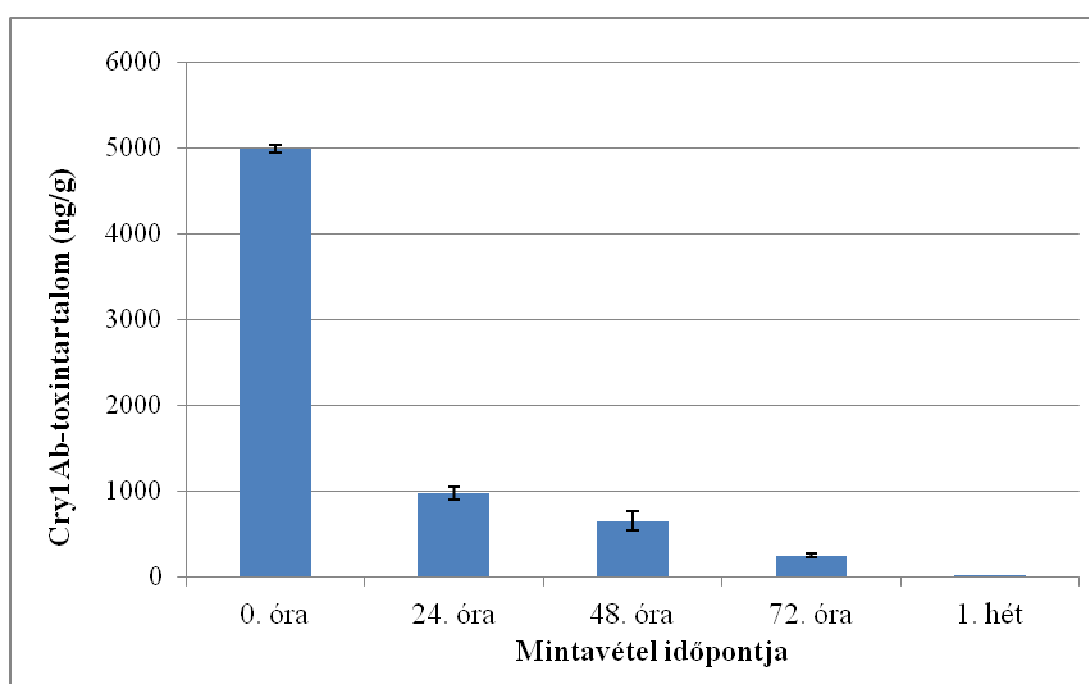
A természetes vizekből eredő mátrixhatás meghatározásához a Dunából, illetve a Velencei-tóból származó vízmintákat mesterségesen szennyeztük a kiindulási levélben megtalálható toxinok mennyiségével a liofilizálás előtt és után. A visszanyerés mértékét mindkét toxin és mindkét akváriumvíz esetében a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: Cry-toxin-visszanyerés mértéke a mesterségesen szennyezett vízmintákban

	<i>Spike</i> liofilizálás előtt / után	Cry1-toxin visszanyerés (%)	Cry3-toxin visszanyerés (%)
Velencei-tó	előtt	0	0
	után	98,7	71,1
Duna	előtt	0	0
	után	74,6	66,8
Desztillált víz	előtt	69,9	82,9

A különböző mintavételi időpontokban vett *MON 810* kukorica nedves levélminták Cry1Ab-toxin tartalmának meghatározása során a kimutatási határ 13,87 ng/g volt. A Velencei-tóból származó vizet és iszapot tartalmazó akváriumban a transzgenikus változat

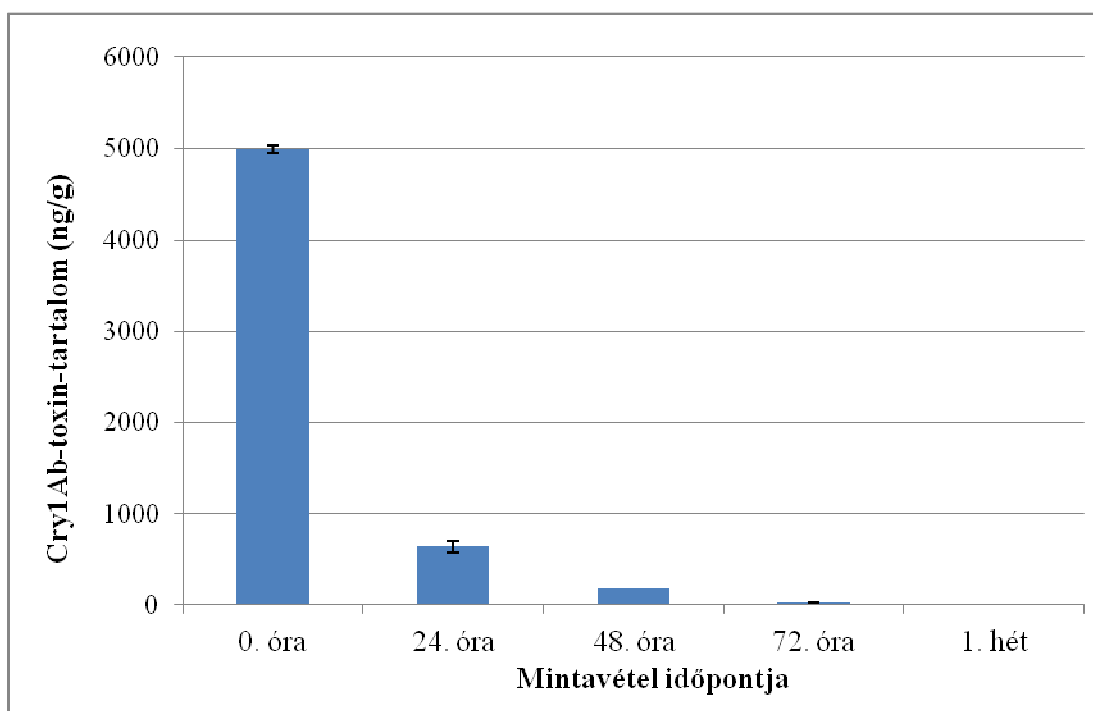
levélmintáinak esetében a toxintartalom csökkenő mennyisége figyelhető meg. 24 óra elteltével a toxin koncentrációja a levélben közel 80%-kal csökkent, a kioldódás mértéke ezt követően azonban mérséklődött (20. ábra). 1 hét elteltével a kimutatott toxin mennyisége megközelíti a kimutatási határt, viszont a mérési határ alatt (MH=33,69 ng/g) volt, tehát 1 hét elteltével az ELISA módszerrel csak a toxin jelenléte bizonyítható, a kapott koncentrációérték nem tekinthető pontos értéknek. A Cry1Ab-toxin koncentrációértékek időbeni csökkenését, tehát az eltelt idő és a kapott koncentráció értékek közötti összefüggést lineáris regresszióval értékeltük ki, az adatok log-transzformálását követően. Ezáltal igazoltuk az eltelt idő és a csökkenő koncentráció értékek között összefüggést ($p=0,00000076$, $R^2=0,9593$).



20. ábra. A Cry1Ab-toxintartalom változása az eltelt idő függvényében a *MON 810* kukoricavonal transzgenikus változatának levélmintáiban a Velencei-tó esetében

A Velencei-tóhoz hasonlóan a Duna esetében is kijelenthető, hogy az összes vízminta Cry1Ab-toxintartalma a kimutatási határ alatt volt. A kukorica transzgenikus levélmintáinak esetében a toxintartalom az idő függvényében csökkent, 24 óra elteltével itt még nagyobb csökkenés következett be. A toxin koncentrációja a levélmintákban 1 nap elteltével az eredeti mennyiség 12%-ára esett vissza, a kioldódás mértéke ezt követően sokkal kisebb volt (21. ábra). 72 óra elteltével a kimutatott toxinkoncentráció megközelítette a kimutatási határt, viszont a mérési határ alatt (MH=33,69 ng/g) maradt. 72 óra elteltével az ELISA módszerrel

ebben az esetben is csak a toxin jelenléte bizonyítható, a kapott koncentrációérték nem tekinthető pontosnak.



21. ábra. Cry1Ab-toxin tartalom változása az eltelt idő függvényében a *MON 810*-es kukoricavonal transzgenikus változatának levélmintáiban a Duna esetében

A Cry1Ab-toxinkoncentráció értékek időbeni csökkenését, tehát az eltelt idő és a kapott koncentrációértékek közötti összefüggést lineáris regresszióval értékeltük ki, az adatok logaritmikus transzfomálását követően. A lineáris regresszió elvégzésével igazolható az eltelt idő és a csökkenő koncentrációértékek közötti összefüggés ($p = 0,0000005$, $R^2 = 0,9887$).

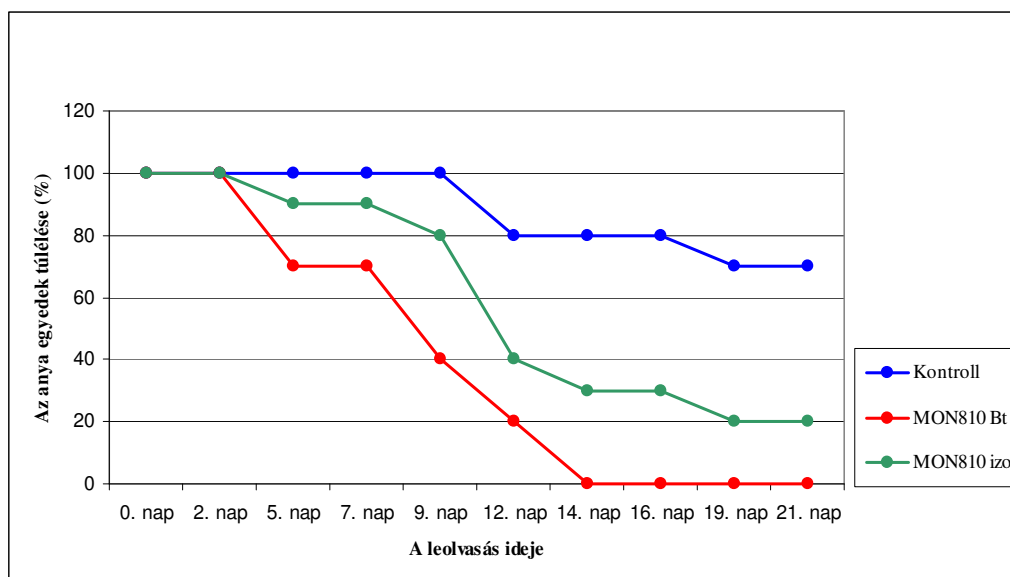
A *DAS 59122-7* kukorica esetében ELISA módszerrel a Cry34Ab1-toxintartalmat mértük a levél-, illetve a vízmintákban mindkét akváriumtípus esetében. A levélben található kiindulási toxinkoncentráció mindkét esetben az 1. nap alatt több, mint 90%-kal csökkent, azonban ez az erős csökkenő tendencia a további napokban nem volt kimutatható. E toxin esetében sem sikerült az akváriumvizekből visszamérnünk az esetlegesen bekerült toxin koncentrációt.

Az akváriumvizekbe került levéltörmelék analitikai vizsgálatai mellett a biológiai hatás értékeléséhez toxikológiai tesztek is végeztünk két modellfajon. Akut vizsgálatokba *Daphnia magna* és *Aedes aegypti* fajok fiatal egyedeit vontuk be, az Anyagok és módszerek

fejezet 3.2.5. pontjában leírt módszert alkalmazva. A vizsgált kukoricafajták egyik változatának esetében sem tudtunk akut toxikus hatást kimutatni sem a csípőszúnyoglárvaikon, sem a vízibolhaegyedeken.

A krónikus toxicitási vizsgálatokba – mivel az elszáradt növényi törmelék nem okozott akut toxicitást – zölden szedett, és kiszárított levéltörmeléket vontunk be, mivel ezek toxintartalma magasabb. Az előzetes analitikai mérések alapján a kiindulási toxintartalom a *MON 810* kukorica esetében 7159 ± 805 ng/g, míg a *DAS 59122-7* esetében Cry34Ab1-toxinra 81,1 ng/mg, a Cry35Ab1-toxinra 75,1 ng/mg volt, mely korábbi mérés eredménye (Takács et al., 2012).

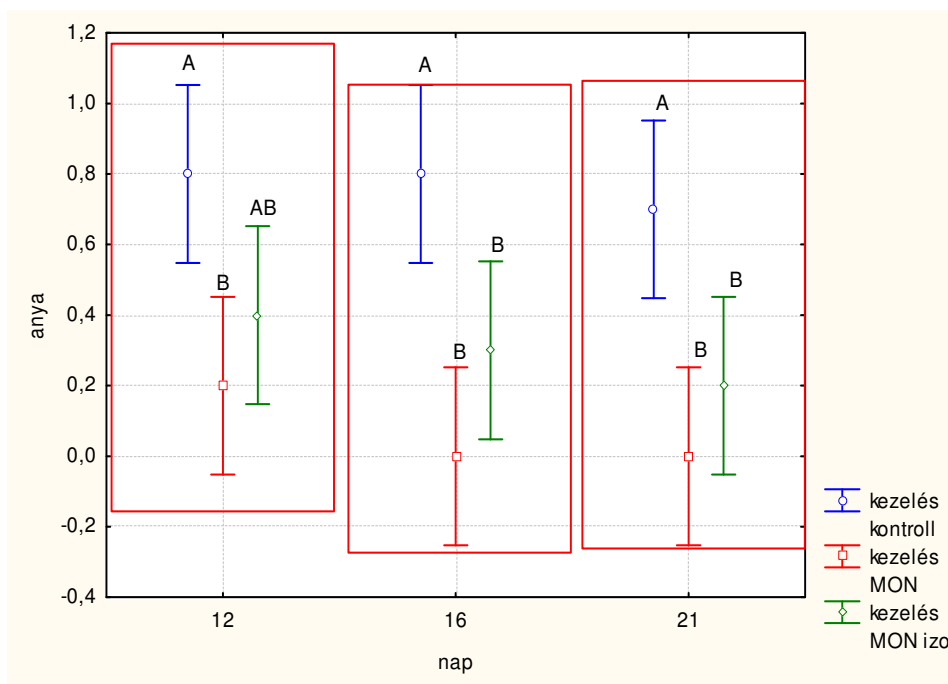
A *Daphnia magna*-val végzett krónikus tesztben *MON 810* kontrollcsoportnál a kezelés 9. napjáig nem volt megfigyelhető az anyák pusztulása, míg a transzgenikus és közel izogenikus változatok esetében már az 5. napon volt mortalitás a vizsgált egyedek között (22. ábra). A legjelentősebb mortalitás a transzgenikus változat esetében volt megfigyelhető, ahol a vizsgálat 14. napjára az összes anya elpusztult. A kísérlet végére a kontrollcsoportban volt megfigyelhető a legkisebb mértékű mortalitás. A különböző kukoricaváltozatokkal történő etetés hatása statisztikailag igazolható volt ($p \leq 0,000001$).



22. ábra. Az anyaegyedek százalékos túlélése az eltelt napok függvényében a *MON 810* kukorica esetében

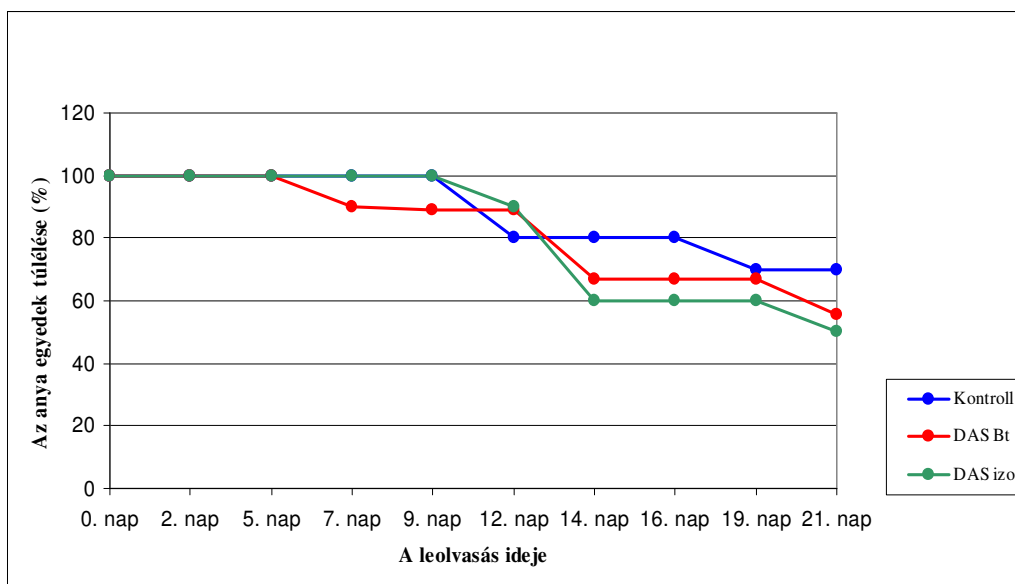
A vizsgálat 12., 16. és 21. napján elvégzett összehasonlítás során a 12. napon statisztikailag igazolható különbséget csak a transzgenikus változattal etetett csoport és a kontrollcsoport között tudtunk kimutatni. A 16. és a 21. napon elvégzett összehasonlítás során

a kontrollcsoport mind a két nap esetében különbözött az eltérő kukoricaváltozatokkal etetett csoportoktól, a kukoricaváltozatok (transz- és közel izogenikus) hatásai között viszont nem tudtunk statisztikailag igazolható különbséget kimutatni, bár a közel izogenikus változatokban a túlélési % magasabb volt (23. ábra).



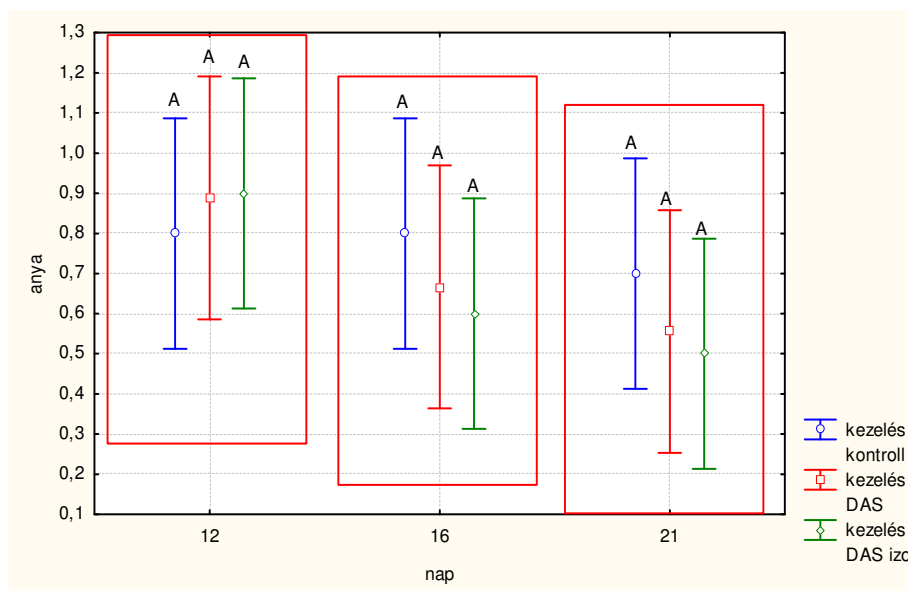
23. ábra. A kezelések hatásának összehasonlítása a vizsgálat különböző napjain a *MON 810* kukorica esetében

A *DAS 59122-7* kukoricavonal esetében a vizsgálat 9. napjáig nem volt megfigyelhető az anyák pusztulása a kontroll-, illetve a közel izogenikus változattal etetett csoportnál. A transzgenikus csoportnál viszont a 7. napon megfigyelhető volt mortalitás a vizsgált egyedek között (24. ábra). A kísérlet végére a kontrollcsoportban volt megfigyelhető a legkisebb mértékű mortalitás, míg az anyaegyedek százalékos túlélése a közel izogenikus változat esetében volt a legalacsonyabb.



24. ábra. Az anyaegyedek százalékos túlélése a *DAS 59122-7* kukorica esetében

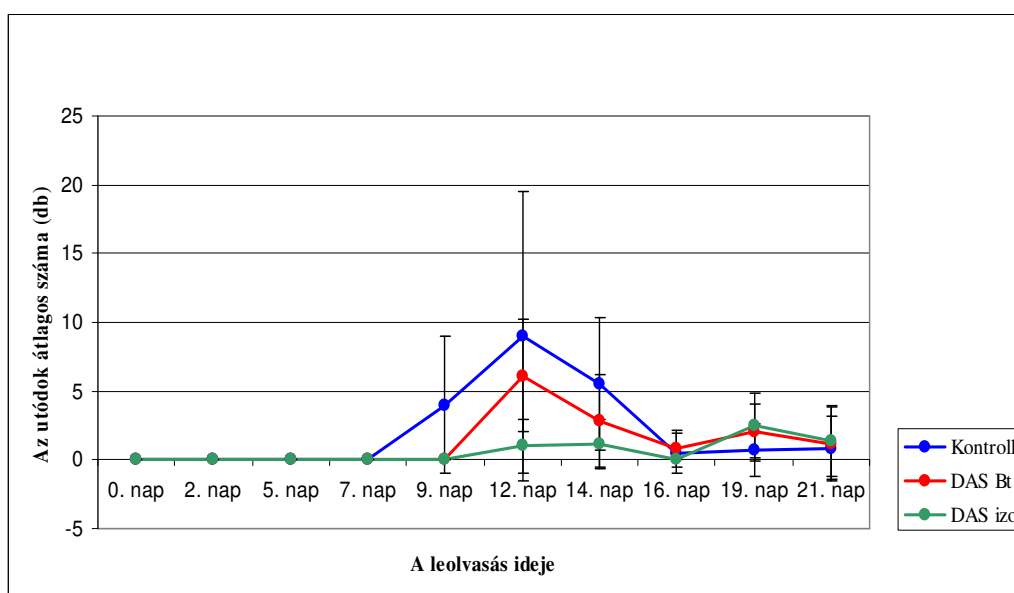
A *DAS 59122-7* kukoricafajta esetében a különböző kukoricaváltozatokkal történő etetés hatása statisztikailag nem volt igazolható ($p = 0,693$). A vizsgálat 12., 16. és a 21. napján elvégzett összehasonlítás során egyik esetben sem volt kimutatható különbség a kezelések között (25. ábra).



25. ábra. A kezelések hatásának összehasonlítása a vizsgálat különböző napjain a *DAS 59122-7* kukorica esetében

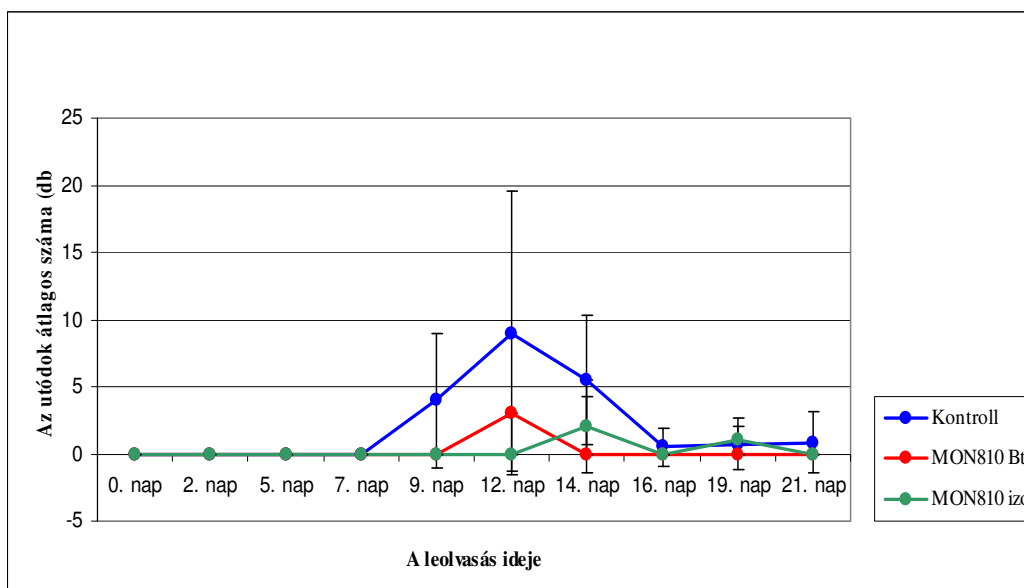
A *DAS 59122-7* kukoricavonallal folytatott vizsgálat teljes idejére vonatkozó Kaplan-Meier-elemzés elvégzésével sem volt kimutatható szignifikáns különbség a különböző kezeléseknek az anyaegyedek túlélésére gyakorolt hatása között. Ezzel szemben a *MON 810* esetében szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni a kontrollcsoport és a különböző kukoricaváltozatokkal etetett csoportok között, továbbá a különböző kukoricaváltozatok anyaegyedek mortalitására gyakorolt hatása között.

Az anyaegyedek túlélésén túl a reprodukciós teszt az utódok számának alakulását is figyelemmel kíséri. Amint az várható volt, a *DAS 59122-7* kukorica esetében az utódprodukció a hagyományos módon etetett kontrollcsoportban volt a legjelentősebb, már a 9. napon megfigyelhető volt az anyaegyedek reprodukciója. A különböző kukoricaváltozatok esetében a 12. napig nem volt megfigyelhető az utódok jelenléte (26. ábra). Az átlagos utódszám a közel izogénikus változat esetében volt a legalacsonyabb.



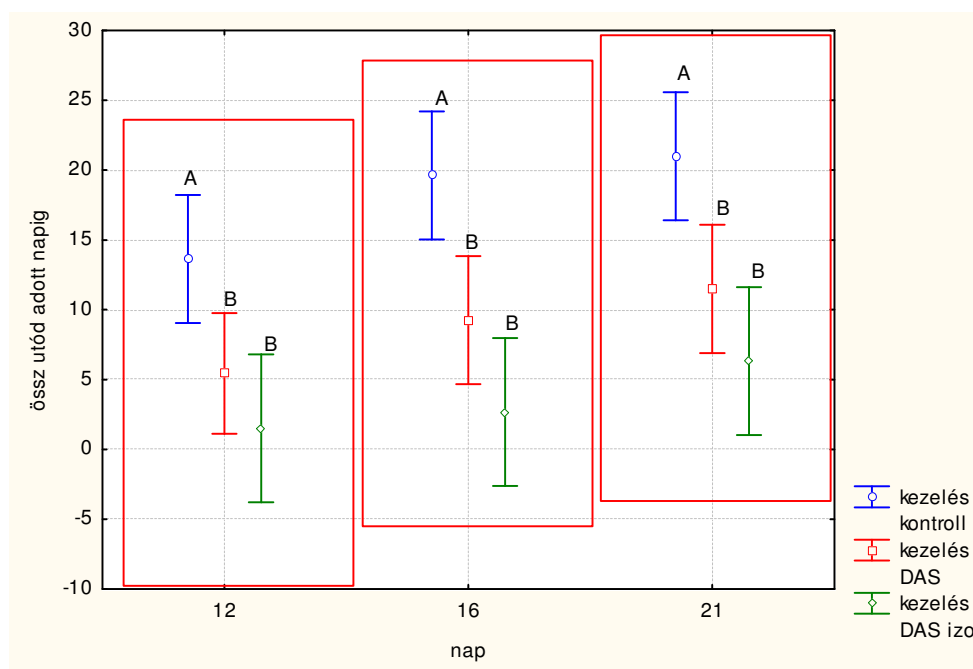
26. ábra. Az utódok átlagos száma naponként a *DAS 59122-7* kukorica esetében

A *MON 810* kukorica esetében szintén a kontrollcsoportban volt a legjelentősebb, és ebben az esetben is a 9. napon jegyeztünk fel először utódprodukciót. A transzgenikus és közel izogénikus változatok esetében jelentéktelen mennyiségű utód keletkezett, amely az anyaegyedek jelentős mértékű mortalitásával magyarázható (27. ábra).



27. ábra. Az utódok átlagos száma naponként a *MON 810* kukorica esetében

Az utódprodukcióra gyakorolt hatások statisztikai kiértékelését csak a *DAS 59122-7* kukoricafajta esetében tudtuk elvégezni, mivel a *MON 810* kukoricafajtánál az anyák sorozatos, nagymértékű elhullása miatt az utódprodukció statisztikai értékelésére nem volt lehetőség. A *DAS 59122-7* kukoricavonalnál statisztikailag a különböző kukoricaváltozatokkal történő etetés utódprodukcióra gyakorolt hatása igazolható volt ($p=0,0001$). A vizsgálat 12., 16. és 21. napján elvégzett összehasonlítás során mindegyik nap esetében kijelenthető, hogy a kontrollcsoport szignifikánsan eltér a különböző kukoricaváltozatokkal etetett csoportoktól, a különböző kukoricaváltozatok hatásai között viszont nem tudtunk statisztikailag igazolható különbséget kimutatni (28. ábra).



28. ábra. A kezelések hatásának összehasonlítása a vizsgálat különböző napjain a *DAS 59122-7* esetében

4.2.2. A Cry4-toxinnal végzett vizsgálatok eredményei

A Cry4-toxin analitikai kimutatására saját fejlesztésű ELISA rendszert használtunk. Az ELISA rendszer felállításához az analitikai paraméterek figyelembe vételével határoztuk meg az optimális reagenskoncentrációt, a kimutatási határt és az érzékenységet. A konjugátum, amelyet glutáraldehid módszerrel nyertünk, csak akkor biztosítja a minimális még mérhető jelet, ha hígítás nélkül alkalmazzuk (a Cry4-specifikus antitestek burkoló rétegeként 1:100 hígításban). Azonban a jelintenzitás 1:2 PBST hígításban eltűnik. Az antitest-HRP konjugátumot, melyet perjodát módszerrel nyertünk, 8 koncentrációban alkalmazzuk 1:50 és 1:13.000-es hígítások között, s így az optimális arány 1:100 lett. A kimutatási határ (KH) az optimalizált ELISA rendszerben 2 ng/ml értékűnek adódott Cry4-toxinra. Szignifikáns mátrixhatást tapasztaltunk, amikor hígítatlan készítményt mértünk, valószínűsíthetően a bennük megtalálható koagulációgátló segédanyagok jelenlétének köszönhetően. Amíg az ELISA módszerrel mért Cry4-toxin koncentráció 40-szeres Cry4-toxintartalombeli különbséget mutatott a készítmények között, addig a biológiai hatás csupán 2,5-szeres különbséget jelzett (3000 ITU/mg a granulátumra és 1200 ITU/mg a szuszpenzióra). Összehasonlításként megmértük a Cry4 toxin koncentrációját a NRRL HD-968 *Bti* törzs fermentációs médiumában is, ahol az 51,4%-os mortalitást okozó hígított fermentum Cry4-

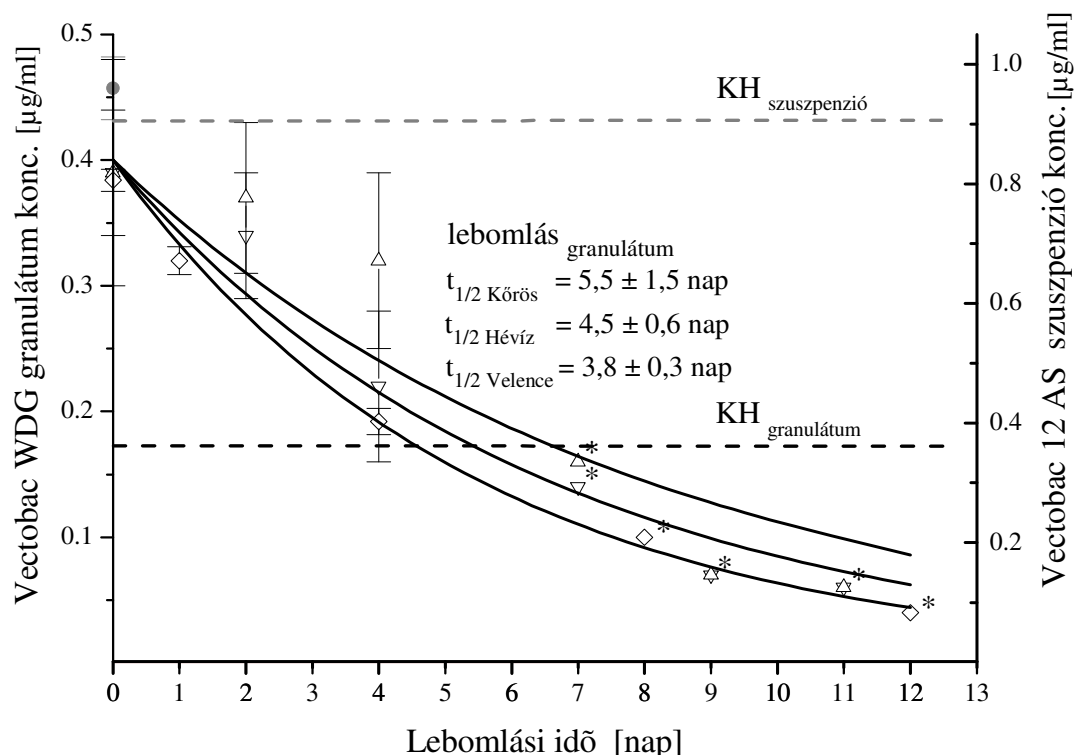
toxin koncentrációja 15,4 ng/ml értékű volt. Ez jó egyezést mutat a folyékony készítményre meghatározott koncentrációval. A mátrixhatások esetleges következménye lehet, hogy a *Bti*-készítmények gyakorlati KH-értéke túl magas a szignifikánsan alacsony dózisok kimutatására (0,4 µg/ml granulátumra és 1 µg/ml szuszpenzióra). A mintákat emiatt előzetesen töményíteni kell, azonban ehhez a szilárd fázisú extrakció nem alkalmazható. Így az előzetes töményítéshez liofilizációt és újraoldást végeztünk desztillált vízben. A vízminták szárazanyagtartalma 1,13 és 1,76 mg/ml értékűnek adódott ($1,47 \pm 0,19$ mg ml⁻¹). A Cry4-toxin visszamérése mérsékelt volt ugyan, de közel állandónak mondható ($25,7 \pm 6,8\%$). Így a gyakorlati KH a liofilizációval egybekötött ELISA rendszerre a Vectobac WDG-re és a Vectobac 12 AS-re rendre 170 illetve 900 ng/ml.

A *Bti*-készítmények hatékonyságának változását az analitikai mérésekkel párhuzamosan, *Aedes aegypti* lárvatesztel mértük. Mivel a készítmények viszonylag gyorsan fejtik ki hatásukat, emiatt a 24 és 48 órás eredmények között nincs lényegi különbség, a mortalitást 24 óránként olvastuk le. Az előteszt során Vectobac 12 AS készítményre a 24 órás LC₅₀-és LC₉₅-értékek rendre 0,78 (0,75-0,82) mg/l és 1,03 (1,00-1,07) mg/l értékűnek, míg a 48 órásak rendre 0,76 (0,74-0,78) mg/l és 0,99 (0,97-1,02) mg/l értékűnek adódtak. Mivel célunk a készítmények alkalmazott dózisának tesztelése volt, így a Vectobac 12 AS esetében 1,0 mg/l koncentrációt választottuk, mely közel teljes mortalitást okozott tesztállatainkon. A granulátum formátumú Vectobac WDG-nél az alkalmazott dózis 0,2 és 0,8 kg/ha közötti, hígítás nélkül (10 cm-es vízmagasságra átszámítva 0,2-0,8 mg/l-nek vettük). A kalkulált 24 és 48 órás eredmények az LC₅₀- és LC₉₅-koncentrációkra azonosnak mutatkoztak: 0,26 (0,19-0,30) mg/l és 0,39 (0,38-0,40) mg/l. A kísérletben alkalmazott dózist ez alapján 0,4 mg/l-ben határoztuk meg.

A szúnyog-tenyészőhelyekről (Velencei-tó, Hévíz és Körös-folyó környékéről) beszerzett víz- és iszapmintával berendezett akváriumokkal dolgoztunk, hogy minél jobban reprezentáljuk a környezeti feltételeket. A tesztakváriumok mellett berendeztünk desztillált vizes kontrollt is azonos körülmények között, de szúnyogok nélkül. Ehhez a toxin spontán lebomlásának vizsgálatához volt szükség, hogy kiszűrhesük a természetes vizek esetleges mátrixhatásait. Egy másik, csapvizes kontrollakváriumba nem juttattunk a toxinból, így abban kizárólag a csípőszúnyogok kezelés nélküli mortalitását mértük.

A *Bti*-toxin időbeli lebomlását a különböző akváriumvizekben a 29. ábra szemlélteti. Az adatokból jól látszik, hogy a Vectobac WDG kezdeti 0,4 µg/ml koncentrációja ($0,39 \pm 0,07$ µg/ml) 5, 13 és 18%-kal csökkent a 2. napra a Körösről, Hévízről és a Velencei-tóról származó vizet tartalmazó akváriumban. Ez a csökkenés később tovább folytatódott, a 4.

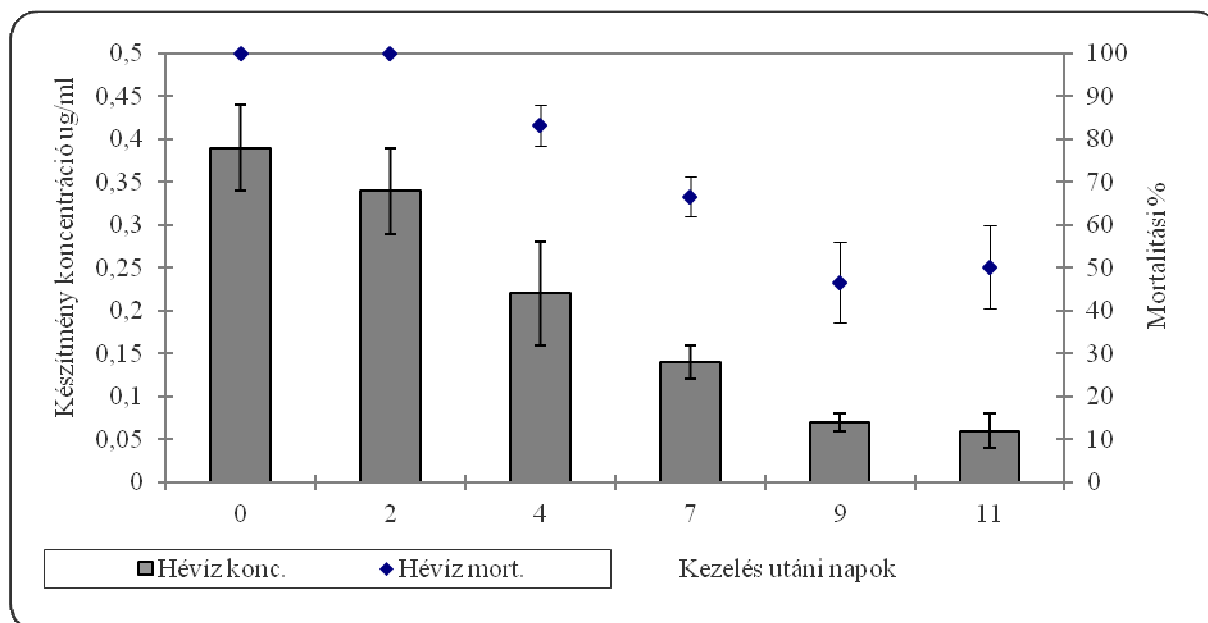
napra 18, 44 és 54%-os csökkenés következett be, majd a koncentráció a kimutatási határ (KH) alá esett. A csípőszúnyoglárvaikon nyert mortalitási adatok alapján extrapoláltuk a koncentrációgörbe KH alatti lefutását. Ez alapján látható, hogy további csökkenés következett be, azonban fontos megjegyezni, hogy a lárvamortalitás nem szükségszerűen követi a vízben csökkenő toxinkoncentráció hatását, mivel a Cry-toxint táplálkozás közben a lárvák az üledékből is felvehetik. A granulátum féléletidejét a Velencei-tó, Hévíz és Körös vizet tartalmazó akváriumokban $3,8\pm0,3$; $4,5\pm0,6$ és $5,5\pm1,5$ napban állapítottuk meg. A szúnyoglárva mortalitási tesztjének eredményei alapján a Körös folyóból származó, kevesebb szerves anyagot tartalmazó akváriumban a szúnyoglárva mortalitása 100%-hoz közeli maradt a *Bti*-készítmény beadását követő 7. napig. A túlélő lárvák aránya később növekedni kezdett, és a kísérlet utolsó napjára (11. nap) elérte az 52%-ot. Ezzel szemben, a hévízi környezetből származó víz- és iszapmintát tartalmazó akváriumban – melyben nagy mennyiségben volt megtalálható elhalt szerves anyag, avar – a kezelést követő 4. napra 83%-ra, majd a 9. napra 46%-ra csökkent a mortalitás. Az utolsó ellenőrzéskor kapott 50% mortalitást befolyásolhatta, hogy a víz felszínén vastag baktérium-filmréteg alakult ki, ami gátolta a lárvák levegőhöz jutását. A Velencei-tó esetében a hévízhez hasonlóan alakult a mortalitás az első héten, a 9. napon azonban 55%-os, a 11 napon pedig 48%-os pusztulást mértünk, vagyis ebben az esetben folyamatosan csökkent az elpusztult egyedek száma.



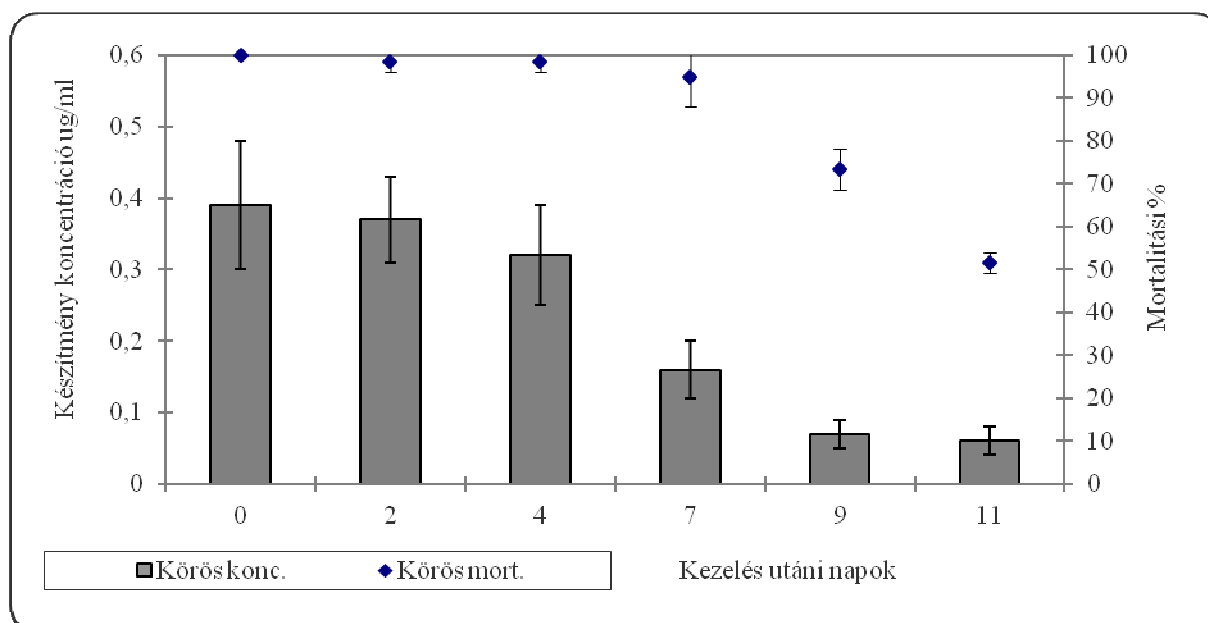
29. ábra. A *Bti*-toxin időbeli lebomlása felszíni vizekben, direkt „szendvics” ELISA mérés alapján. A Cry4-toxin koncentrációjának alakulása az eltelt napok függvényében a Vectobac WDG készítmény használatakor a Körös (Δ), Hévíz (∇) és Velence ($\diamond$) akváriumokban, illetve a Vectobac 12 AS kezdeti koncentrációja ($\bullet$). A csillaggal (*) jelölt koncentrációkat a KH alatt a csípőszúnyoglárva-mortalitás alapján extrapoláltuk.

A Vectobac 12 AS folyékony készítmény kezdeti, alkalmazott koncentrációja $1,0 \mu\text{g/ml}$ volt. Ez a koncentráció csak kevéssel haladja meg az ELISA kimutatási határt, emiatt a toxinkoncentráció csökkenését csak a lárvamortalitási teszt segítségével sikerült követnünk. A Velencei-tó esetében a folyékony formátumú készítmény hatástartama jóval rövidebb volt, mint a granulátumnak. A mortalitás a 4. napra 35%-ra csökkent, és a 7. napra teljesen megszűnt.

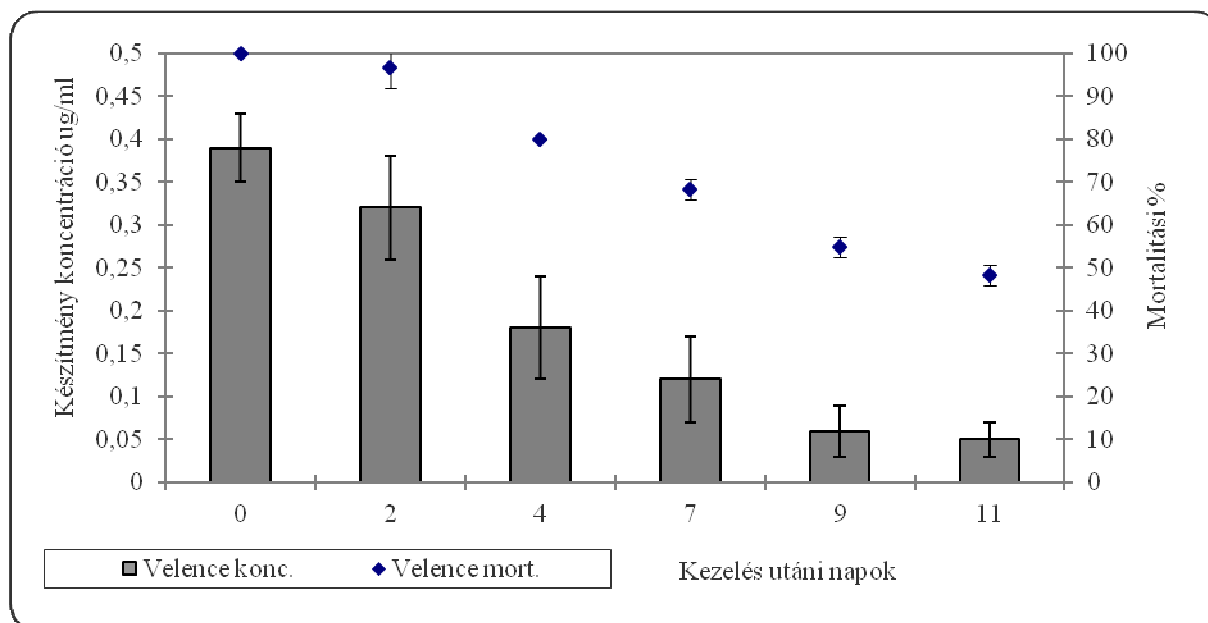
Az analitikai és a mortalitási adatokat a jobb követhetőség érdekében oszlopdiagramokon is ábrázoltam (30.-33. ábra).



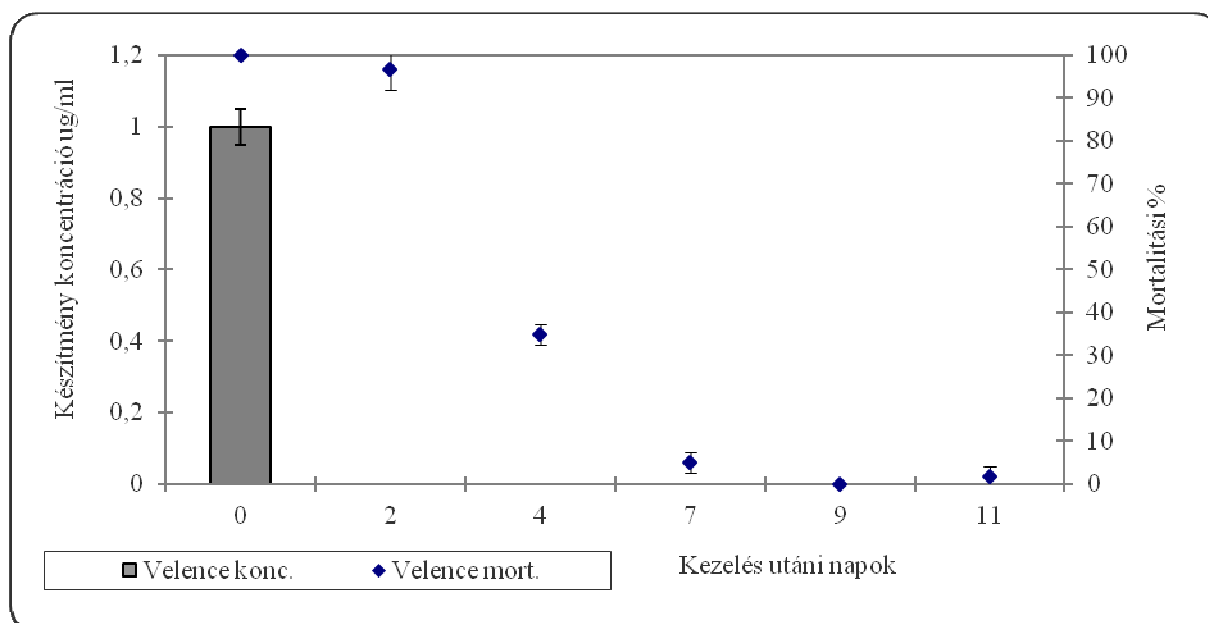
30. ábra. A Vectobac WDG Cry4-toxin koncentrációja és a szúnyoglárva-mortalitás alakulása a Héviz akvárium esetében



31. ábra. A Vectobac WDG Cry4-toxin koncentrációja és a szúnyoglárva-mortalitás a Körös akvárium esetében



32. ábra. A Vectobac WDG Cry4-toxin koncentrációja és a szúnyoglárva-mortalitás a Velencei-tó akvárium esetében



33. ábra. A Vectobac 12 AS Cry4-toxin koncentrációja és a szúnyoglárva-mortalitás a Velencei-tó akvárium esetében

5. Megvitatás és következtetések

5.1. Ipari és mezőgazdasági eredetű szennyezések kimutatás- és hatásvizsgálatainak eredményei

Az élőlények környezetükben folyamatosan ki vannak téve különböző szennyezőknek, melyek főként antropogén forrásokból erednek (Cedergreen et al., 2008). Legfőképp a vízi élőlények vannak veszélyben, mivel ők egész életüket vagy életük bizonyos szakaszait vízben töltik, és így állandó érintkezésben vannak összetett vízszennyezőkkel. A Talajmonitoring Információs Rendszer fejlesztési programjának részeként hozzánk beérkező, eltérő művelésű földterületekről származó víz- és talajminták szennyezőanyag-tartalmát vizsgáltuk egy több éves projekt keretében. Ennek eredményeként a vizsgált talajminták 18%-ában, míg a vízminták közel 38%-ában mutattunk ki növényvédőszer-szennyezéseket. Szennyezettnek akkor tekintettünk egy mintavételi pontot, ha egy szennyező anyag koncentrációja vagy az összes szennyező együttes jelenléte meghaladta a jogszabályban előírt küszöbértéket. Legmagasabb szennyezettségi szinteket azon a gyomaendrődi mintavételi ponton mértünk, ahol korábban illegális növényvédőszer-lerakás zajlott. Ez a pontszennyezés veszélyezteti mind a talajvizet, mind a parti szűrészű nyers ivóvizet.

A növényvédő szerek engedélyezési folyamatában fontos szerepet kap a nem célszervezetekre kifejtett káros hatás kimutatása. Kiemelkedően fontos a vízi szervezetek kockázatbecslése, ennek eredményeként a víztoxicitást minden engedélyezett peszticid aktív hatóanyag engedélyezésénél vizsgálni kell. Ennek egyik széles körben használt modellállata a *Daphnia magna* zooplankton faj, mellyel szennyezők önmagukban és keverékeikben is vizsgálhatóak (Barata et al., 2007). Ezen vizsgálatok tiszta hatóanyaggal, illetve készítménnyel történnek, azonban az anyag kikerülve a környezetbe számos egyéb hatásnak van kitéve, amelynek hatására megváltozhat a toxicitási profilja. A kijuttatott növényvédő szerek különböző lefolyásokon keresztül kapcsolatba kerülhetnek nem csak a kiemelt fontosságú ivóvízbázisokkal, hanem időszakos kisvizekkel is, melyek biodiverzitásának megőrzése nem elhanyagolható feladat. Kísérleteinkben modellezni kívántuk, hogy a korábban kipermetezett vegyszerek – melyek az eltelt idő alatt mobilizálódhattak, felhígulhattak és degradálódhattak – milyen hatást gyakorolnak a vízi mikroszervezetekre. A növényvédőszer-maradékok mellett az esetlegesen szennyező mikroelem-tartalmat is vizsgáltuk mind a víz-, mind a talajminták esetében. A mikroelemek toxicitása minden esetben nagyban függ az elemek koncentrációjától és speciációjától. A toxicitási adatokat

általában a leggyakoribb előfordulású formára adják meg. Emellett, a fémek toxikussága vizes környezetben nagyon széles spektrumban mozog, az eltérő környezeti feltételek (pH, szervesanyag-tartalom, vízkeménység, hőmérséklet stb.) és a hatásnak kitett élőlény érzékenységétől függően (Kozlova et al., 2009).

Az általunk vizsgált vízminták nagy része nem tartalmazott letális koncentrációban jelen lévő növényvédőszer-maradékot, így a vártak megfelelően, nem okozott akut mortalitást a tesztállatainkon. A felszíni vizekre meghatározott határérték feletti koncentrációkban előforduló szennyezők önmagukban szintén nem okoztak pusztulást (pl. V4A1, V6A0 mintáknál). Ez az adat nem meglepő, ha összevetjük a kimutatott koncentrációkat a *Daphnia magnára* a szakirodalomban fellelhető LC₅₀-értékekkel (6. táblázat). Számos minta azonban nagyszámú, szubletális koncentrációban jelen lévő szennyezőt tartalmazott (pl. V1D1, V3A0, T1E3). Az alacsony koncentrációban előforduló összetett vízszennyezők additív hatásainak értékelése az elmúlt években nagyobb figyelmet vívott ki a kutatásban. Addíció és szinergizmus figyelhető meg szubletális koncentrációjú *diazinon*, *malathion* és *chlorpyrifos* szerves foszforsav-észter inszekticidek között, ezüstlazacon (*Oncorhynchus kisutch*) vizsgálva (Laetz et al., 2009). Egy 2013-as tanulmány számos, molekuláris szintű toxikológiai kölcsönhatást ír le növényvédőszer-keverékek között, mint például piretroidok, karbaril- és triazin herbicidek (Hernández et al., 2013). Az általunk vizsgált mintákban feltehetően hasonló interakciók játszódtak le a szennyezők között. A V1E1 és V1G1 jelű ipari eredetű vízmintákban mért *acetochlor* és *atrazine* hatóanyagok és bórszennyezések között szinergista hatások érvényesülhettek, mivel a minták magas toxicitásának mértékét a szennyezők egyenkénti toxicitási értékei nem indokolták. Az egyébként látszólag magas koncentrációk messze alatta maradnak az irodalmi, egyenkénti, vízibőlhára meghatározott LC₅₀-értékeknek. Egy másik, azonos helyről származó vízminta (V1D1) alacsony koncentrációjú szennyezőket tartalmazott (*diazinon*, *acetochlor*, *metolachlor*), és magas (65%) mortalitást okozott a tesztállatokon. A mintában, az alacsony növényvédőszer-szennyezettség mellett alacsony rézkoncentráció (7,2 µg/l) volt kimutatható. Ez jóval alatta van a jogszabályban meghatározott határértéknek (200 µg/l), viszont a réz leggyakoribb speciációinak LC₅₀-értéke *D. magnán* 6-18 µg/l (Nebeker et al., 1986), így a magas toxicitásra ez ad magyarázatot. Egy másik, *diazinont* és LC₅₀-értékhez közeli koncentrációjú rezet tartalmazó, ökológiai területről vett vízminta esetében (V2F1), a hozzáadott LC₅₀-koncentrációjú *diazinon* hatóanyag jelenléte nem váltotta ki a várható hatást, ebben az esetben felmerül az antagonista kölcsönhatás gyanúja. E két anyag keverékének antagonista hatásait már korábban leírták ágascsapú rák- (*Ceriodaphnia dubia*), illetve kérészfajon (*Ephoron virgo*) vizsgálva (Banks et

al., 2003; van der Geest et al., 2000). Az intenzív mezőgazdasági területről származó V3A0 jelű mintánál alacsony *diazinon*-, a szennyezettségi határértéket meghaladó, de a *D. magna* LC₅₀-értéket el nem érő bór- és azt meghaladó rézszenyezettség mellett 40%-os mortalitást tapasztaltunk. Ez az eredmény feltehetően a *diazinon* és a réz antagonizmusával magyarázható. Számos mintában sok, szubletális dózisban jelen lévő növényvédőszer-maradék és szennyezőelem-tartalom fordult elő (pl. V1F1, V6B1), melyeknél akut hatásokat nem tudtunk kimutatni tesztállatainkon. A szubletális dózisban előforduló szennyezőknek való kitettség azonban nemcsak a keverékhatások kialakulása miatt fejt ki hosszabb távon toxikus hatást, hanem emellett növeli a tesztállatok időbeni kitettségét (lassabb fejlődés) és érzékenységét egyéb környezeti faktorokra, mint a betegségek (főként vírusos és baktériumos), ragadozók és parazitoidok általi létszámcsökkenő hatások, vagy az UV-sugárzás (Janssens és Stoks, 2013; Beketov et al., 2011; Kelly et al., 2010). Továbbá, a peszticideknek hosszantartó, alacsony koncentrációjú kitettség egyéb környezeti tényezőkkel képes szinergizálni, egymás hatásait felerősíteni (pl. stresszfaktorok, predáció, kompetíció, abiotikus faktorok), és ezek károsíthatják a közösség szerkezetét (Mann és Bidwell, 1999; Perkins et al., 2000). A talajminták esetében a T1E3 mintánál királyvizes feltárás során 24,6 mg/kg mennyiségű rézszenyezetést mértünk. Az e mintával elvégzett desztillált vizes feltárás ennél jóval kevesebb, 10 mg/kg koncentrációban mutatta ki a rézet, azonban még ebben a mennyiségben is felette van a *Daphnia magna* LC₅₀-értékének. A mintában emellett még szennyezettségi határértéket meghaladó mennyiségű nikkel volt megtalálható. A talajminta vizes oldata összességében közel 100%-os mortalitást okozott a tesztállatainkon. A T3A0 minta esetében szintén a nagy mennyiségben jelen lévő réz válthatta ki a tapasztalt magas mortalitást.

Vizsgálataink nem terjedtek ki a detektált hatóanyagok konkrét keverékhatásának felmérésére, így a szinergista, antagonista és additív hatások megfigyelése egyelőre feltételezésen alapul. A tényleges hatások feltárásához a célvegyületek toxikológiai vizsgálatai szükségesek, azonban még így sem biztosítható az adott környezeti minta összetételének és hatáskifejtésének pontos ismerete. Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a korábbi monitorozó program részeként kimutatott szennyezők egyedi hatásainak ismerete nem elegendő a környezetbe kijuttatott anyagok különböző kombinációi együttes hatásának feltárásához.

A vízminták nagy *glyphosate*-szennyezettsége számos okra vezethető vissza. A hatóanyag a *glyphosate*-rezisztens transzgenikus (GR) növények (pl. RoundupReady[®] szója, kukorica) elterjedésével vált a világ legtöbbet használt gyomirtójává (Woodburn, 2000). Az eredeti,

preemergens (kelés előtti) használati módot felváltotta a kelés utáni (posztemergens) alkalmazás, ezzel pedig jelentősen nőtt a környezetterhelés (Székács és Darvas, 2012b). Bár az Európai Unió országaiban a GR-növények termesztése nem engedélyezett, a *glyphosate* forgalma – főként totális gyomirtó hatása miatt – itt is magas, 2012-ben a második legtöbbet eladott hatóanyag (953 220 kg) volt a kén után (NÉBIH, 2012). Mivel a *glyphosate* igen jól oldódik vízben (11,6 g/l 25 °C-on), így a hatóanyag az esővízzel még a talaj mélyebb rétegeibe is eljuthat, annak ellenére, hogy bizonyos körülmények között gyorsan bomlik, és erős a komplexképző hatása (Vereecken, 2005). A felszíni vizek *glyphosate*-szennyezettsége erősen változhat a mintavételi hely és idő függvényében, mivel a jó vízdoldékonyság miatt esővízzel könnyen mobilissá válik, és kimosódik a talajból. Emiatt még a kezelés helyétől viszonylag nagy távolságban is detektálható, és ilyen módon könnyen kapcsolatba kerülhet vízi környezettel és abban élő szervezetekkel. Normál környezeti feltételek mellett még 70 nap után is kimutatható a környezetben. A felszíni vizekben akár 10-15 µg/ml *glyphosate*-koncentrációértékeket mérnek világszerte (Byer et al., 2008; Struger et al., 2008; Mörtl et al., 2013). Az általunk vizsgált felszíni-, és felszín alatti vizek fele tartalmazott 0,54 és 0,98 ng/ml között tartományban *glyphosate*-szennyezést. Ez az érték *D. magna* tesztállatra vonatkozóan szubletális koncentrációt jelent (LC_{50} =780 mg/l), azonban a vízi életmóddal krónikus kitettség valósul meg. Mivel az állandó kitettség, még ha az adott anyag szubletális koncentrációban van is jelen, jelentősen károsíthatja az élőlényeket, ezért a *glyphosate* hatóanyag további vizsgálatát tartottuk célszerűnek. A *glyphosate* hatóanyaggal kapcsolatban az utóbbi években számos (öko)toxikológiai, mellékhatás-vizsgálatokról szóló tanulmány látott napvilágot. Káros hatásait mikroalgán és egyéb vízi szervezeten több esetben vizsgálták. (Sáenz et al., 1997; DeLorenzo et al., 2001; Le et al., 2010; Ríco-Martinez et al., 2012; Sandrini et al., 2013; Pérez et al., 2012). Azonban napjainkban nem kizárólag az aktív hatóanyagnak, hanem annak készítményei, illetve formázóanyagai szubletális hatásvizsgálatainak is különös figyelmet szentelnek (Pérez et al., 2012). A *glyphosate* hatóanyag mellett számos készítményben megtalálható POEA formázóanyag toxicitása ismert kételtűeken (Edginton et al., 2004; Howe et al., 2004; Tsui és Chu, 2003; Marc et al., 2005). A hatás nélkülinek vélt formázóanyag (*inert ingredient*) toxicitása jóval meghaladta az aktív hatóanyag (*active ingredient*) toxicitását, így a legtoxikusabb összetevőnek bizonyult a készítményben (Brausch et al., 2007; Cuhra et al., 2013; Sandbacka et al., 2000). Ezzel szemben, akut tesztben a Roundup készítmény kissé alacsonyabb toxicitást mutatott, mint az aktív összetevő (*glyphosate*), bár krónikus tesztben ennek ellenkezője mutatkozott (Waters, 1999). A POEA megváltoztathatja a sejtek permeabilitását, ezzel növeli az aktív hatóanyag bejutását, s így a

sejtek pusztulását okozhatja (Bénachour és Séralini, 2009). *Daphnia magnán* vizsgálva a *glyphosate* és készítményei csökkentették az utódok testméretét, és gátolták növekedésüket, emellett a szaporodási rátájukra is negatívan hatottak (Cuhra et al., 2013). Más vízi élőlények esetében (kagylókon és halakon), gátolták a kolinészteráz működését (Sandrini et al., 2013). Egy nemrégiben publikált tanulmányban az aktív hatóanyagnak illetve a készítményeknek nem csupán az egyedekre vonatkozó hatásait figyelték meg, hanem közösségi szinten is végeztek vizsgálatokat, megállapítva, hogy az antropogén forrásból származó stresszfactorok (pl. peszticidek) felerősíthetik a természetes stresszorok (pl. predáció) hatásait (Janssens és Stoks, 2013).

Saját kísérletünkben sem kizárólag az aktív hatóanyagot vizsgáltuk, hanem kereskedelmi forgalomban kapható formázott készítményét, a Roundup Classic-ot, illetve a formázóanyagát (POEA) is. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan, *D. magna* tesztállatunkra (standard, laboratóriumi populáció) legtoxikusabbnak a POEA bizonyult ($> 3,1$ mg/l), míg legkevésbé toxikusnak a tiszta aktív hatóanyag (100-1700 mg/l). A készítménynek (Roundup Classic), amelyben 43% víz, 41,5% *glyphosate* hatóanyag mellett 15,5% POEA található, toxicitása az aktív hatóanyag és a formázószer mortalitási koncentrációi között helyezkedik el, azonban közelebb van a POEA LC_{50} -értékéhez (> 20 mg/l) (9. táblázat). Cuhra és munkatársai 2013-as cikkükben közöltek adatokat akut és szubletális krónikus kitettség hatásairól *glyphosate* és Roundup esetében *D. magnán*. Eredményeik alapján *glyphosate* izopropil-amin-sójjára és a Roundup készítményre szignifikánsan nagyobb érzékenységet (rendre 1,4-7,2 mg/l, illetve 3,7-10,6 mg/l) tapasztaltak az irodalmi LC_{50} -értékekhez képest. Nemrégiben jelent meg egy átfogó cikk a herbicidek zooplanktonokra gyakorolt hatásairól, a jelentősen szóró LC_{50} -értékeikről *D. magnán* és egyéb *Daphnia*-fajokon (Rico-Martínez et al., 2012). Annak bizonyítására, hogy a rendkívül szóró irodalmi LC_{50} -értékek akár egy fajon belül is jelentősen eltérhetnek, vizsgálatainkat két, eltérő származású *Daphnia*-populáción is elvégeztük. A standard populáción kívül egy begyűjtött és több generáción keresztül laboratóriumban tartott vad típusú törzzsel is elvégeztük a mortalitási tesztet. A standard törzshöz hasonlóan, a legkisebb toxicitás a *glyphosate* hatóanyagra volt jellemző (360 mg/l), ezt követi a Roundup (18,7 mg/l) és végül a POEA (1,45 mg/l). Jól látható, hogy mindhárom érték alacsonyabb a másik csoportnál mért eredményeknél. Az általunk tapasztaltakhoz hasonlóan, Cuhra és munkatársai is megfigyeltek jelentős különbségeket a *Daphnia*-populációk érzékenységében, azonban a mi értékeinknél kisebb mértékben (Cuhra et al., 2013). Úgy tűnik, jelenleg még nincs magyarázat arra, hogyan értelmezhető a környezeti faktorokra vonatkozó érzékenység nagy vízíbolhán, mivel az irodalmi adatok és saját méréseink szórásai is rendkívüli

mértékűek. Ha az átlagosan alkalmazott mezőgazdasági koncentrációból (kb. 4 l ha⁻¹) egy 10 cm magasságú vízoszlopba bejutó mennyiséget kalkulálunk, modellezve a közvetlen vízbe kerülést (*glyphosate*, Roundup és POEA koncentrációi rendre 1,44; 4 és 0,62 mg/l), láthatjuk, hogy alatta van az általunk mért LC₅₀-értékeknek, azonban szubletális hatásaikkal minden bizonnyal számolni kell.

9. táblázat: A *glyphosate*, POEA és Roundup akut LC₅₀-értékei *D. magna* tesztállaton

Összetevő	LC ₅₀ (mg/l) [konfidenciaintervallum]	
	mért	irodalmi
<i>glyphosate</i>	900 [750 – 1080] ^a 360 [100-480] ^b	1,4-7,2 (Cuhra et al., 2013) 780 – 930 (Tomlin, 2000), 962 (Tu et al., 2001)
<i>POEA</i>	3,3 [3,1-5,1] ^a 1,28 [0,8-1,8] ^b	0.097 – 0.849 (Brausch et al., 2007) 3 (2,6-3,4) (Folmar, 1979)
Roundup	20,6 [17,8-30,6] ^a 18,7 [15,3-33,6] ^b	3,7-10,6 (Cuhra et al., 2013) 11 (R. Classic, Monsanto, 2012) 24-37 (R. Original, Monsanto, 1998)

^a standard populáció (szabvány szerinti),

^b laboratóriumban szelektált vad típus (begyűjtött vad törzs)

A *glyphosate* herbicid további vizsgálatait tartottuk indokoltnak, egyéb vízi élőlényeken. A zebradánió (*Danio rerio*) halfajra azért esett a választásunk, mivel embrionális fejlődése nagyon sok részletében hasonló a fejlettebb gerincesek embriogeneziséhez, így megfelelő modellállata lehet toxikológiai vizsgálatoknak (Kimmel et al., 1988; Kimmel et al., 1995). Az LC₅₀-értékek ennél a teszttypusnál is hasonlóan alakultak: legtoxikusabbnak a formázóanyag

(POEA) bizonyult (5 mg/l), ezt követte a formázott készítmény 90 mg/l értékkel. A *glyphosate* aktív hatóanyag a legmagasabb, általunk mért koncentrációban (9750 mg/l) sem váltotta ki a tesztállatok 50%-ának pusztulását. A teszt során az irodalmi adatokkal összhangban lévő eredmények születtek, melyeket a 10. táblázat tartalmaz.

Halakban, több előzetes tanulmányban a Roundup és a *glyphosate* különböző mértékű oxidatív stresszt váltott ki a tesztállatoknál (Modesto és Martinez, 2010; Lushchak et al., 2009; Ferreira et al., 2010). 1-20 mg/l közötti koncentrációjú különböző Roundup formulációknak rövid idejű kitettség hatására (0-6 nap) számos halfajnál DNS-károsítás lépett fel, és megváltozott a sejtek antioxidánsszintje (Cavas és Konen, 2007; Cavalcante et al., 2008).

10. táblázat: A *glyphosate*, POEA és Roundup LC₅₀ értékei embrionális teratogenitási teszt során *Danio rerio* tesztállaton

Összetevő	LC ₅₀ (mg/l) [konfidencia intervallum]	
	mért (embrionális)	irodalmi (felnőtt hal)
<i>glyphosate</i>	>9750	97-1000 (Tomlin, 2000) ¹ 86 (USDA, 1984) ²
<i>POEA</i>	5 [4,5-5,4]	2 (USDA, 1984) ³ 2-18 (Folmar, 1979) ⁴
Roundup	90 [78-147]	8,3 (USDA, 1984) ⁵

¹ tűzcselle (*Pimephales promelas*), pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*), kékkopoltyús naphal (*Lepomis macrochirus*), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)

^{2, 3, 4} szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)

⁵ tűzcselle (*Pimephales promelas*), pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*), kékkopoltyús naphal (*Lepomis macrochirus*), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)

A zebradánió, mint modellállat alkalmazása ezen a területen viszonylag újnak számít, így kevés adat található meg ezzel kapcsolatban a szakirodalomban. Jofré és munkatársai 2013-as cikkében kétféle, 480 g/l koncentrációjú *glyphosate* herbicid haltoxicitását vizsgálták felnőtt állatokon, sajnos azonban a formázóanyag egyik esetben sem volt ismert. Eredményeik alapján 48 mg/l-es koncentrációt LC₁₀₀ értéknek adták meg, azaz az összes állat elpusztult, míg 24 mg/l-es koncentrációban minden tesztállat életben maradt (LC₀) (Jofré et al., 2013). Egy másik cikkben a *glyphosate* hatóanyag és formulált készítményeinek hatását vizsgálták *D. rerio* halfajon, szubletális koncentrációban. Kifejlett halakkal dolgozva azt találták, hogy ezen anyagok oxidatív stresszt és kimutatható károsítást okoztak a szteroid típusú nemi hormonok szintézisében. Saját eredményeinkkel ellentétben már 100 mg/l *glyphosate*-koncentrációnál magas embrionális mortalitást tapasztaltak, míg ugyanez a Roundup készítménynél csak 1000 mg/l körüli dózison következett be. Szubletális koncentrációknál a fejlődés lassabban történt, a lárvák kelése később következett be (Webster et al., 2014).

A zebradánió embrión kiváltott szubletális hatások eredményeinek értékeléséhez jelenleg még nem áll rendelkezésre kidolgozott módszer. Az OECD 236. szabvány a mortalitást kiváltó paraméterek megfigyelését írja elő, melyekből LC₅₀ értékek számíthatóak. Emellett azonban számos esetben szubletális hatások is megfigyelhetők, melyekhez a paraméterek súlyozási rendszerét a további kutatások során fogjuk kialakítani.

A fenti hatóanyagok folyamatosan növekedő terhelő adatainak és kiemelkedő gyakoriságú alkalmazásának figyelembe vételével a környezeti kockázatok újraértékelése és az esetleges szubletális, keverékhatások további megfontolása fontos feladattá vált a jövőre nézve. Emellett az ún. inert anyagok felülvizsgálata és toxikológiai értékelése – a fenti eredmények alapján is – megkerülhetetlen lépéssé kell válnia a növényvédő szerek engedélyezésének és forgalomba hozatalának folyamatában.

5.2. Cry-toxinok kimutatás- és hatásvizsgálatainak értékelése

A Cry-toxinokat termelő transzgenikus növényekről leváló növényi részek, illetve az elszáradt tarlómaradvány szél által vagy a mezőgazdasági területek közelében lévő vizes lefolyások útján kapcsolatba kerülhetnek a vízi életközösségekkel. Egy szántóföld közelében futó vízmosásba bekerülve a tarlómaradvány vagy a pollen a detrituszba süllyedhet, távolabbi víztestekbe sodródhat el, illetve a finomabb frakció biofilmet képezhet. Ilyen módon a toxin a vízi ökoszisztémába kerülve károsíthatja annak élővilágát (Rosi-Marshall et al., 2007; Viktorov, 2011). Az általunk összeállított akváriumi rendszerrel modellezni kívántuk az így

kialakult helyzetet, megfigyelve az esetlegesen elfogyasztott Cry-toxintartalmú növényi részek vagy a belőlük kioldódó toxin hatásait a mikroorganizmusokon. Ehhez a kísérlet során analitikai és toxicitási tesztekkel folyamatosan monitoroztuk az akváriumvíz és a behelyezett növényi részek toxintartalmát és annak hatásait. Két különböző kukoricafajtával (*MON 810* és *DAS 59122-7*) és két eltérő helyről származó élővízmintával dolgoztunk (Duna és Velencei-tó).

A transzgenikus *MON 810* kukoricavonal által termelt Cry1Ab-toxin a különböző akváriumokból származó vízmintákban egyik kukoricaváltozat esetében sem volt kimutatható. Ennek egyik oka lehet, hogy a vízben lévő toxin erősen kötődik a természetes víz száraanyag-tartalmához, melyet előzően több esetben leírtak (Pagel-Wieder et al., 2004). A mi kísérletünkben erre utal az is, hogy a liofilizálás előtt mesterségesen szennyezett desztillált vízből a toxintartalom visszamérhető volt, míg a liofilizálás előtt szennyezett természetes vízmintákból nem. Habár a Cry1Ab-toxin sokkal gyorsabban degradálódik vizes közegben, mint a talajban, egyéb kutatások alapján még akár 40 nap múlva is kimutatható volt egy *Bt*-kukoricatábla közelében megtalálható felszíni vízfolyásban illetve az üledékben (Douville et al., 2005). A detritusz vízben történő lebontását jelentős mértékben befolyásolja a vízben élő lebontó szervezetek összetétele, mérete, aktivitása, továbbá a hőmérséklet és a légköri CO₂-koncentráció (Coviella et al., 2002; Swan et al., 2009; Viktorov 2011). A két, különböző helyről származó vizet tartalmazó akvárium nedves levélmintáiban a toxinszint csökkenése hasonló mintázat szerint zajlott, az első 24 óra alatt drasztikusan csökkent a toxintartalom (Velencei-tó esetében az eredeti 20%, míg a Duna esetében az eredeti 12%-ára), majd ezt követően a csökkenés mértéke lelassult. A Velencei-tóról származó víztípus esetében egy hét elteltével csökkent a kimutatási határ (13,87 ng/g) alá, míg ugyanez a dunai vizet tartalmazó akváriumban 72 óra alatt következett be. Eredményeinkhez hasonló csökkenési mintázatot tapasztaltak Griffiths és munkatársai is, esetükben vizes közegben a száraz transzgenikus kukoricatörmelék Cry1Ab-toxintartalma 60%-kal csökkent már az első 1 óra alatt, viszont a későbbiekben a folyamat lelassult és a toxin jelenléte még 70 nap elteltével is kimutatható volt (Griffiths et al., 2009).

A *DAS 59122-7* transzgenikus kukorica levéltörmelékeiben, vizes közegben a Cry3-toxinok koncentrációjának csökkenését tapasztaltuk. Az első 24 óra elteltével mindkét akváriumvíz esetében az eredeti mennyiség 10%-ára esett vissza a toxintartalom, azonban ez a tendencia a továbbiakban mérséklődött, tehát az előzőekhez hasonló módon zajlott a folyamat. Az esetlegesen vízbe kerülő toxint ez esetben sem tudtuk kimutatni.

Kísérleteinkben mindkét kukoricavonal esetében a levelekben mért toxintartalom az első 24 óra elteltével erőteljesen lecsökkent, azonban ezzel párhuzamosan, a vízmintákból toxint nem tudtunk kimutatni. E jelenség valós okainak feltárására kísérletünk nem terjedt ki, az okok tekintetében csak feltételezésekkel élhetünk. Egyik ok lehet, hogy a toxin a rendelkezésre álló idő alatt nem tudott kijutni a kukoricák sejtfallal határolt sejtjeiből. Az analitikai mintaelőkészítés során fizikai behatással (dörzsmozsárban dörzsöléssel) a sejtfal roncsolása történik, így biztosítva a toxin kijutását. Jelen kísérletben célunk a valós helyzet szemléltetése volt, a tarlómaradványokat így nem roncsoltuk előzetesen. Egy másik feltételezés szerint a levelekbe bejutó víz segítségével a növényi sejtfal felnyílik és az élővizek vízi mikrobiális közössége a fehérjetoxint gyorsan lebontja.

A toxintartalmú növényi tarlómaradványok vízi életközösségekbe kerülése napjainkban valós problémát jelez. Tank és munkatársainak 2010-es cikkében *Bt*-növénytáblák 500 méteres környezetében vizsgálták meg a vizes élőhelyeket fél évvel a betakarítás után. A monitorozott területek 86%-ában mutattak ki tarlómaradványt, amely 13%-ában tartalmazott Cry1Ab-toxint, a vízből pedig az esetek 26%-ában volt kimutatható a toxin (Tank et al., 2010). Saját kísérletünkbe a vízi életközösségek két gyakori és eltérő táplálkozású tagját, a nagy vízibolhát (*Daphnia magna*) és az egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti*) lárváit vontuk be, hogy modellezni tudjunk egy makroszkopikus gerinctelen közösséget. Míg a vízibolhák fitoplantonnal táplálkoznak, addig a szúnyoglárva széles spektrumú táplálékot elfogadnak, szerves törmelék is elfogyasztanak. Az általunk vizsgált kukoricafajták különböző változatai akut tesztben egyik modellfajunk mortalitására sem voltak hatással. Hasonló eredményre jutottak Mendelson és munkatársai, akik 48 órás akut tesztükben Cry1Ab-toxintartalmú kukoricapollen hatásának tették ki a nagy vízibolha egyedeit, azonban nem tapasztaltak mortalitást (Mendelson et al., 2003). Mivel az akut tesztek során a megfelelő akváriumokból származó víz volt a tesztközeg, felmerülhet, hogy ebben az esetben is a toxin a természetes vizek szárazanyag-tartalmához kötődött, így a hatáskifejtés nem következett be. Ezzel az eredménnyel egybevág, hogy az analitikai módszerrel sem tudtunk toxint kimutatni az akváriumvizekben.

A továbbiakban az akut tesztek mellé krónikus, etetési vizsgálatokat is elvégeztünk *Daphnia magna* tesztorganizmen, mindkét módosított kukoricavonal esetében. Korábbi etetési tesztben a fiatal vízibolhaegyedek érzékenyen reagáltak a Cry1Ab-toxin jelenlétére, a kukorica transzgenikus vonalának magörleményével etetett egyedek túlélési aránya, illetve utódprodukciója alacsonyabb volt a közel izogén kukoricával etetett egyedekhez képest (Bohn et al., 2010). Az általunk elvégzett, Cry1Ab-toxintartalmú levélörleménnyel történő

etetéses vizsgálata során az anyák pusztulása szignifikánsan nagyobb volt a kukoricával etetett csoportok esetében, azonban a transzgenikus és izogénes vonalak között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Ennek egyik oka lehet, hogy a levélőrlemény nem tartalmazza azokat a megfelelő tápanyagokat a *Daphnia* számára, mint a természetes tápláléka, az alga. Emellett a kukoricalevélben előfordulhatnak egyéb olyan növényi eredetű allelokemikáliák (pl. DIMBOA), melyek kifejtethetnek negatív hatásokat a vízibolhára. Bohn és munkatársai nem a szabvány 21 napos reprodukciós tesztet végezték (OECD 211), hanem annak kétszer hosszabb időtartamú változatát, melyben a szignifikáns eredmények a teszt második felében jelentkeztek. Ez az időbeli eltérés lehet a másik oka eltérő eredményeinknek. Ez a különbség emellett felvetheti az OECD szabvány teszt időzítésének problémáját is, mivel fennáll a lehetősége, hogy 21 nap nem elegendő *Daphnia magna* etetéses tesztben krónikus hatások kimutatására.

A DAS 59122-7 kukoricák esetében az előzőekhez hasonlóan a kontrollcsoport túlélése volt a legmagasabb, azonban szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a különböző csoportok között. A reprodukcióra gyakorolt hatásokat csak ennél a kukoricavonalnál tudtuk értékelni. A legnagyobb utódszám ebben az esetben is a kontrollcsoportnál volt megfigyelhető, a transzgenikus és izogénikus kukoricaváltozatok közötti különbség azonban statisztikailag nem volt igazolható. Ebben az esetben az utódreprodukció kisebb mértéke elsősorban szintén a kukoricával való táplálással magyarázható. Az általunk elvégzett vizsgálatok és a szakirodalomban megtalálható adatok alapján kijelenthető, hogy akut tesztek elvégzésére csak magasabb toxintartalmú módosításoknál lehet szükség, jelen kukoricavonalak esetében nagyobb hangsúlyt kell fektetni a hosszabb távú vizsgálatok elvégzésére. A *Daphnia magna* egyedeken elvégzett reprodukciós vizsgálatok kísérleti rendszere fejlesztésre szorul, annak érdekében, hogy a kukoricával való táplálás hatása és a toxin hatása egyértelműen elkülöníthetővé váljon. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy ezek a vizsgálatok a fenti körülményekkel nem adnak választ a toxintartalmú levéltörmelék hatásaira, kísérleteink alapján úgy tűnik, a *Daphnia magna* testszervezet nem a legmegfelelőbb ehhez a kísérlethez. Távolabbi célunk olyan vízi gerinctelen fajok felkutatása, melyek táplálékpreferenciája közelebb esik a vizsgálandó növényhez, így a toxin hatása könnyebben elkülöníthető lenne.

A Cry-toxinok lebomlásának vizsgálatai sorában a Cry1- és Cry3-toxinokat követően a Cry4-toxin degradációját figyeltük meg beállított akváriumos kísérletben. A teszt során szennyeg-tenyészőhelyekről (Hévíz térsége, Velencei-tó, Körös folyó térsége) származó vizet

és szerves anyagot tartalmazó akváriumokban monitoroztunk kétféle Cry4-toxintartalmú készítmény (Vectobac 12 AS, Vectobac WDG) hatástartamát és lebomlását analitikai és toxicitási tesztek segítségével. Az analitikai mérések ELISA módszerrel történtek, melyet saját fejlesztésű rendszerrel végeztünk. Ennek oka az volt, hogy nem volt elérhető megfelelő, forgalomban kapható Cry4-toxin kimutatására alkalmas ELISA kit.

A jelölő enzimnek a torma-peroxidázt (HRP) választottuk, amely széles körben használt ELISA teszteknel, erős enzimaktivitása miatt illetve, hogy a biológiai minták összetevői esetleges gátló hatásainak jobban ellenáll (Tijssen, 1985). Az antitestekhez kovalensen kötöttük a HRP-t, amelyre két módszer létezik: egy kétlépéses konjugáció glutáraldehiddel, illetve az ún. perjodát módszer. Mivel az irodalmi adatok alapján a glutáraldehides konjugáció kisebb hatékonyságú (Harlow és Lane, 1988), így mi a perjodát eljárást alkalmaztuk. Az optimalizált ELISA rendszer kimutatási határa a Cry4-toxin koncentrációjára 2 ng/ml, ugyanakkor a gyakorlati kimutatásai határ Vectobac WDG granulátumra ~170 ng/ml, míg Vectobac 12 AS esetében 900 ng/ml. Ez a határ túl magas a szignifikánsan alacsony dózisú készítmények meghatározására. Az ELISA rendszer jelenlegi magas kimutatási határa betudható a ténynek, hogy a fedő antiszérum és riporter enzim konjugációnál használt antiszérum ugyanaz volt. Eltérő eredetű antitestek használata (pl. monoklonális antitestek egérből) a fedésre illetve az enzim konjugátumban akár egy nagyságrenddel javíthat a kimutatási határon, bár az irodalmi KH-k szignifikánsan magasabbak (20 ng/ml), még monoklonális antitest használatával is (Oestergaard et al., 2007). Esetünkben, mivel egyéb antitestek nem voltak elérhetőek, csak a vízminták előzetes töményítésére volt lehetőség. A liofilizációval történő mintatöményítési technika hátránya az alacsony visszanyerési arány, mely valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a minta szárazanyag-tartalmához a toxin erősen kötődik, és a visszaoldás során nem válik le. A Cry4-fehérje adszorbeálódását az ásványianyag-tartalomhoz már korábban leírták (Lee et al., 2003). Bár a rossz visszamérési arány csökkenti a rendszer gyakorlati érzékenységét, amennyiben az arány állandó, úgy a módszer meghatározásra alkalmas. A tóvízből készített referenciamintákban a granulált készítményt 0,4 µg/ml, szuszpenziót 1 µg/ml koncentráción mértük meg. A mérések során csak 22-28%-os kimutatási visszanyerést sikerült elérni, ez azonban közel állandónak bizonyult, ezért korrekciós faktorként figyelembe vettük. A módszer tehát vízminták esetében alapos minta-előkészítés után alkalmazható, iszapmintáknál viszont e kötődési folyamat miatt jelenleg még nem megfelelő.

Méréseink és eredményeink alapján megállapítható, hogy a Cry4-toxintartalmú készítmények szúnyog-tenyészőhelyeken történő alkalmazása során az adott készítmény

hatékonysága erősen függ a környezeti folyamatoktól (terjedés, dekompozíció). A szerves és szintetikus szerves mikroszennyezők megoszlását az iszap-víz fázisban többször modellezték (Nowell et al., 1999; Chiou, 2002). A *Bti*-készítmények használata során is elengedhetetlen, hogy ismerjük a fehérje-összetevők egyszerű megoszlását az iszap-víz között természetes környezetben, azonban ez a mai napig nem feltárt terület. A fehérjeadszorpció montmorillonit kristályon már a talajtan korai évei óta ismert (Ensminger és Gieseking 1939; Pinck, 1962). A kötése erősséget kísérletesen mérték különböző Cry-toxinokra, pl. Cry4 (Lee et al., 2003) vagy Cry1Ab esetében (Pagel-Wieder et al., 2004). A tanulmányok azt mutatják, hogy a Cry4-toxin kötődése az ásványi kristályokon visszaveti a larvicid aktivitást, és szignifikánsan perzisztensebb lesz a szabad toxinnál. A szúnyogmortalitás alakulása esetünkben is jól követte a toxin koncentrációjának változását a vízben, viszont a különböző akváriumok eltérő szervesanyag tartalma nagyban befolyásolta az eredményeket. A talajok ásványianyag-összetétele a talaj mikroorganizmusai aktivitásán keresztül is hatással van a fehérjeadszorpciós jellemzőire (Filip, 1971). Emellett viszont az üledék-víz közötti megoszlási koefficiens a Cry-típusú lektinfehérjékre a mai napig nem írták le, és egyéb fehérjék esetében is kevés adat található az irodalomban (Ding és Henrichs, 2002). A Cry4-toxin biológiai hozzáférhetősége függ az üledék és a vizes fázis összetevőinek jellegétől. A lárvák mortalitását az első vizsgálatkor tapasztaltuk a legnagyobbnak, amikor a toxin szintje a legmagasabb volt a vízben. A toxin ezt követően lebomlásnak indult, illetve adszorbeálódott az üledékben, így a mortalitás a vártnak megfelelően erőteljesen csökkent. Összefoglalva, a mortalitási adatokon alapulva elmondhatjuk, hogy az adott készítmény hatása nagyban függ a víz szervesanyag-tartalmától. A nagy mennyiségű szervesanyagot tartalmazó vizekben a lárvák valószínűleg kevesebb toxint fogyasztanak, mivel a víz egyébként is tápanyagban gazdag, emiatt a hatékonyság is alacsonyabb. Az adatok emellett az is mutatják, hogy a biológiai szúnyoglárváállomány-gyérítés tervezésekor fontos a tenyészhelyek karakterisztikájának kvalitatív és kvantitatív felmérése, mivel ezen adatok ismeretében számítható ki optimálisan a kezelések száma a különböző helyeken.

6. Összefoglalás

A vízszennyező vegyületek jelenléte és esetleges toxicitási értékeik miatt kerültek speciális figyelem alá, mivel a víz nagyszámú mikroorganizmus számára jelenti az élőhelyet, emellett pedig az emberi társadalom is kapcsolatba kerülhet a szennyezőkkel, mivel az ivóvízen keresztül a szennyezőknek való krónikus kitettség valósulhat meg. A gyomirtó szerek nagymértékű, felelőtlen használata a vízi mikrobiális közösségeket direkt vagy indirekt módon megzavarja és csökkenti biodiverzitásukat (Folmar et al., 1979). Egy országos talajmonitorozási program részeként egy kiválasztott magyarországi megye több, eltérő művelésű területéről származó víz- és talajminta analitikai (gázkromatográfiás-tömegspektrométeres eljárás) és biológiai toxicitási (*Daphnia magna* immobilizációs teszt) vizsgálatait hajtottuk végre. Az analitikai vizsgálatok előtt ultrahangos vagy szilárd fázisú extrakciót végeztünk. A *glyphosate* herbicid hatóanyag mérésére immunanalitikai eljárás, validált ELISA kit-et alkalmaztunk. A toxikológiai vizsgálatokhoz a talajokból vizes talajkivonatot készítettünk, a vízminták esetében mintaelőkészítés nem történt. A biológiai hatások felméréséhez az immobilizációs tesztet *Daphnia magna* tesztállat különböző törzsein az ISO 6341:1996 (OECD 202) szabvány alapján végeztük (OECD, 2004). A *glyphosate* herbicid hatóanyag, formázott készítménye (ROUNDUP CLASSIC) és formázóanyaga (polietoxilált faggyúamin, POEA) esetében a *Danio rerio* embrió teratogenitási vizsgálat során az OECD 236 tesztelést követtük (OECD, 2013).

A kapott talajminták 18%-a, míg a vízminták 38%-a tartalmazott kimutatható növényvédőszer-szennyezéseket, többségében alacsony koncentrációkban. Leggyakoribb szennyezőnek az *atrazine* bizonyult. A szermaradék mellett számos szennyező toxikus elem fordult elő, főként bór, szelén, réz és arzén. A vizsgált vízminták 53%-a, míg a talajminták 18%-a volt szennyezett különböző toxikus elemekkel. Nem meglepő módon az ipari területekről származó minták szennyezőanyag-tartalma bizonyult magasabbnak (a minták 74%-a volt szennyezett) a mezőgazdasági területekkel szemben. A vizsgált talaj- és vízminták többsége nem okozott akut mortalitást tesztállatainkon. Néhány erősen szennyezett minta a várt erős toxicitást mutatta, több esetben azonban a szubletális koncentrációban jelen lévő szennyezések megváltoztatták az egyedi toxicitásokat (pl. réz és a *diazinon*). Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a korábbi monitorozó program részeként kimutatott szennyezők egyedi hatásainak ismerete nem elegendő a környezetbe kijuttatott anyagok különböző kombinációi együttes hatásának feltárásához.

A *glyphosate* hatóanyag gyakori előfordulása a vizekben kiemelkedő probléma (Székács és Darvas, 2012b), főként vízszennyező potenciálja és ismert ökotoxikológiai hatásai miatt (citotoxicitás, hormonmoduláns hatás, mutagén/teratogén hatások gyanúja). Ezen hatásokat fokozza, hogy többnyire közös expozíció valósul meg egyik gyakori adalékanyagával, a polietoxilált faggyúammal (POEA), mellyel szinergikus kapcsolatba léphetnek (Székács és Darvas, 2012b). A vizsgált minták mintegy 26%-a tartalmazott *glyphosate* herbicid hatóanyagot, melynek toxikológiai mutatói nagymértékben szórnak, értékelése emiatt nehézkes. Az általunk végzett tesztek során szintén erre az eredményre jutottunk, a két eltérő laboratóriumi *D. magna* törzs között is különbség adódott az érzékenységekben. A herbicid növényvédő szerek formuláló adalékanyagai toxikológiai karakterének feltérképezése szintén az elmúlt években került a figyelem középpontjába. A Roundup Classic növényvédő készítményt, aktív hatóanyagát a *glyphosate*-ot és formázóanyagát, a polietoxilált faggyúamint (POEA) vizsgáltuk *D. magna* vízibolhán és *Danio rerio* halfajon, mortalitási és teratogenitási tesztben. Az irodalmi adatokkal összehangban legtoxikusabbnak a POEA formázószer (LC_{50} *D. magna*ra 0,8-5,1; míg *D. rerio*ra 4,5-5,4 mg/l) mutatkozott, ezt követte a Roundup készítmény (LC_{50} *D. magna*ra 15,3-33,6; míg *D. rerio*ra 78-147 mg/l), a legkevésbé káros pedig az aktív hatóanyag volt (LC_{50} *D. magna*ra 100-1080; míg *D. rerio*ra >9750 mg/l). A *Daphnia magna* toxicitási értékeinek nagy szórásai a kétféle, tesztben résztvevő állomány eltérő érzékenysége miatt adódtak. LC_{50} -hez közeli, szubletális koncentrációkban a vizsgált anyagok a *D. rerio* embriókon főként vérkeringési zavarokat, fejet érintő deformitásokat és a szívritmus gátlását okozták.

Ezen hatóanyagok folyamatosan növekedő terhelő adatainak és kiemelkedő gyakoriságú alkalmazásának figyelembe vételével a környezeti kockázatok újraértékelése és az esetleges szubletális, keverékhathatások további megfontolása fontos feladattá vált a jövőre nézve. Emellett az ún. inert anyagok felülvizsgálata és toxikológiai értékelése – a fenti eredmények alapján is – megkerülhetetlen lépéssé kell válnia a növényvédő szerek engedélyezésének és forgalomba hozatalának folyamatában.

A Cry-toxinok hatástartam- és lebomlásvizsgálatait modellezett környezetben, természetes környezetből (Duna és Velencei-tó) származó víz- és iszapmintával berendezett akváriumokban végeztük el. A transzgenikus, kártevők elleni Cry-toxint termelő kukorica toxintartalmú növényi részei különböző környezeti tényezők segítségével, zölden vagy tarlómaradványként eljuthatnak vizes környezetbe, ahol a kijutó toxin nem célszervezeteket is veszélyeztethet.

A Cry1- és Cry3-toxinok vizsgálatához saját termesztésű, transzgenikus kukorica (*MON 810* és *DAS 59122-7*) és közel izogenikus vonalaik friss és elszáradt növényi törmelékét használtuk fel. A mintagyűjtést követően a berendezett akváriumokba juttattuk a növényi törmeléket, majd meghatározott időközönként analitikai vizsgálatokhoz víz-, míg toxikológiai tesztekhez növényi mintákat vettünk. Analitikai módszerrel (kvalitatív, ill. kvantitatív ELISA kitek) vizsgáltuk a vízbe kerülő toxin mennyiségét az eltelt napok függvényében, emellett akut (OECD 202 ill. WHO, 2006) és krónikus (OECD 211), tesztek végeztünk modellállatainkon (*Daphnia magna* vízibolhán és *Aedes aegypti* szúnyoglárván). Természetes vizekről lévén szó, a mátrixhatás számottevő volt. A teszt során egyik típusú vízből sem tudtunk bekerülő toxint kimutatni, amelyek a toxicitási tesztek során sem okoztak mortalitást a tesztállatokon. A Cry1Ab-toxin kiindulási koncentrációja *MON 810* kukoricalevélben 4986 ng/g volt, mely mindkét típusú akváriumvízben az első 24 óra alatt drasztikusan lecsökkent (Velencei-tavi és Duna vizet tartalmazó akváriumokban rendre 80 illetve 88%-kal), majd a csökkenés lassabb ütemben folytatódott a továbbiakban. Ehhez hasonlóan, a Cry3-toxint tartalmazó levelek toxintartalma az első nap után mindkét akvárium esetében több mint 90%-kal esett vissza. Akut vizsgálatokban egyik típusú kukoricaváltozat tarlómaradványa sem okozott mortalitást vízibolhán és szúnyoglárván. Krónikus vizsgálatokba magasabb toxintartalmú, zölden szedett és kiszárított leveleket vontunk be. Az általunk elvégzett, Cry1Ab-toxintartalmú levélörleménnyel történő etetési vizsgálata során az anyák pusztulása szignifikánsan nagyobb volt a kukoricával etetett csoportoknál, azonban a transzgenikus és izogén vonalak között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. A *DAS 59122-7* kukoricák esetében az előzőekhez hasonlóan a kontrollcsoport túlélése volt a legmagasabb, azonban szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a különböző csoportok között. A reprodukcióra gyakorolt hatásokat csak ennél a kukoricavonalnál tudtuk értékelni. A legnagyobb utódszám ebben az esetben is a kontrollcsoportnál volt megfigyelhető, a transzgenikus és közel izogenikus kukoricaváltozatok közötti különbség azonban statisztikailag nem volt igazolható.

Az általunk elvégzett vizsgálatok és a szakirodalomban megtalálható adatok alapján kijelenthető, hogy akut tesztek elvégzésére csak magasabb toxintartalmú módosításoknál lehet szükség, jelen kukoricavonalak esetében nagyobb hangsúlyt kell fektetni a hosszabb távú vizsgálatok elvégzésére. A *Daphnia magna* egyedeken elvégzett reprodukciós vizsgálatok kísérleti rendszere fejlesztésre szorul, annak érdekében, hogy a kukoricával való táplálás hatása és a toxin hatása egyértelműen elkülöníthetővé váljon.

A Cry4-toxin lebomlási vizsgálatait az előzőekhez hasonló módon végeztük el. Három, különböző természetes környezetből (Hévíz, Velencei-tó, Körös) származó víz- és iszapmintával rendeztünk be akváriumokat, majd ezekbe kétféle kiszerelésű, toxintartalmú készítményt (Vectobac WDG granulátum és Vectobac 12 AS folyadék) juttattunk. Célunk a toxin koncentrációja változásának és az *Aedes aegypti* célszervezetre kifejtett hatásának megfigyelése volt. A toxinkoncentráció méréséhez saját fejlesztésű ELISA rendszert használtunk, mivel nem állt rendelkezésre kereskedelmi forgalomban kapható kit. Természetes vizekről lévén szó a mátrixhatás sajnos itt is magas volt, a Cry-toxin visszamérése vízből azonban állandó maradt (~26%). A gyakorlati kimutatási határ a liofilizációval egybekötött ELISA rendszerre a Vectobac WDG-re és a Vectobac 12 AS-re 170 illetve 900 ng/ml értékű volt. A kezdeti koncentrációkat akut mortalitási tesztek eredményei alapján a granulátum esetében 0,4; míg a folyadék esetében 1 mg/l értékben határoztuk meg. A toxin koncentrációja az eltelt napok függvényében csökkent, a felezési idő a Velencei-tó, Hévíz és Körös akváriumokban rendre 3,8; 4,5 és 5,5 napnak adódott. A szúnyoglárvák mortalitási tesztjének eredményei eltérően alakultak a különböző helyekről származó akváriumi vizekben, amely valószínűsíthetően az eltérő szervesanyag-tartalommal magyarázható. A granulátum esetében a Körös folyóból származó, kevesebb szerves anyagot tartalmazó akváriumban, a szúnyoglárvák mortalitása a 7. napig 100%-hoz közeli maradt, a túlélő lárvák aránya később növekedni kezdett és a kísérlet utolsó napjára (11. nap) elérte az 52%-ot. Ezzel szemben a magasabb szervesanyag-tartalmú hévízi környezetből származó víz- és iszapmintát tartalmazó akváriumban a kezelést követő 4. napra 83%-ra, majd a 9. napra 46%-ra csökkent a mortalitás. Az utolsó ellenőrzéskor kapott 50% mortalitást befolyásolhatta, hogy a víz felszínén vastag baktérium-filmréteg alakult ki, ami gátolta a lárvák levegőhöz jutását. A Velencei-tó esetében szintén folyamatosan csökkent a mortalitás, a 9. napon mért 55%-os érték a kísérlet végére 48%-ra csökkent. A Vectobac 12 AS folyékony készítmény kezdeti koncentrációja 1,0 µg/ml, csak kicsivel magasabb az ELISA kimutatási határánál, emiatt a toxin csökkenését csak a lárvamortalitással sikerült követnünk. A folyékony formátumú készítmény hatástartama jóval rövidebb volt, a mortalitás a 4. napra 35%-ra csökkent, és a 7. napra teljesen megszűnt.

Összefoglalva, a mortalitási adatokon alapulva elmondhatjuk, hogy az adott készítmény hatása nagyban függ a víz szervesanyag-tartalmától. A nagy mennyiségű szervesanyagot tartalmazó vizekben a lárvák valószínűleg kevesebb toxint fogyasztanak, mivel a víz egyébként is tápanyagban gazdag, emiatt a hatékonyság is alacsonyabb. Az adatok emellett az is mutatják, hogy a biológiai szúnyoglárváállomány-gyérítés tervezésekor fontos a

tenyészhelyek karakterisztikájának kvalitatív és kvantitatív felmérése, mivel ezen adatok ismeretében számítható ki optimálisan a kezelések száma a különböző helyeken.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőimnek: Dr. Fekete Gábornak (KÉKI), aki a kísérletes és szakmai munkámat irányította, Prof. Anda Angélának (Pannon Egyetem) és néhai Dr. Nádasy Miklósnak (Pannon Egyetem), akik *PhD* tanulmányaim során voltak segítségemre.

Kiemelt köszönet illeti Prof. Darvas Bélát (NAIK AKK) és Prof. Székács Andrást (NAIK AKK), akik szakmai segítségére kísérletes munkám során gyakran támaszkodtam.

Az analitikai munkákban (GC-MS és ELISA) nyújtott segítségért köszönettel tartozom Dr. Mörtl Máriának (NAIK AKK) és Juracsekné Nádasdi Juditnak (NAIK AKK). Köszönet illeti Takács Esztert (NAIK AKK/SzIE) és Bánáti Hajnalkát (NAIK AKK/ELTE) a szabadföldi GM-kukorica termesztésével és mintagyűjtésével kapcsolatos feladatokban való segítségükért, illetve Nádasdi Józsefet (NAIK AKK), aki a szabadföldi agrotechnikai munkák fizikai részét végezte. A GM-fajták termesztésével kapcsolatos engedélyek beszerzéséért Dr. Fekete Gábornak tartozom köszönettel. Köszönöm Klátyik Szandra (SzIE), Füleki Lilla (BME) és Cséffán Tamás (NAIK AKK) közreműködését az állattenyészetek fenntartásában és a kísérletek kivitelezésében.

Köszönettel tartozom Prof. Thomas Braunbecknek, Katharina Schneidernek és Svenja Böhlernek, akik segítségével a heidelbergi egyetemen (a Campus Hungary ösztöndíja által) elsajátíthattam az embrionális halteszt kivitelezését. Hálás vagyok Dr. Bohus Péternek (Lamberti S.p.A.), aki biztosította számunkra a kísérletben felhasznált *glyphosate* hatóanyagot és formázóanyagait; Czepó Mihálynak (Monsanto Hungária Kft.) és Máté Józsefnek (Pioneer Hi-Bred Zrt.) a GM-fajták és közel izogenikus vonalaik vetőmagjaiért. A talajminták gyűjtésében a Megaterra KMI Kft., míg elemtartalmának meghatározásában az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézetében (ma MTA ATK TAI) munkatársai működtek közre. Köszönet néhai Dr. Anton Attilának a pályázati munka koordinálásáért.

Végezetül szeretném megköszönni a volt MTA Növényvédelmi Kutatóintézet (igazgató Dr. Barna Balázs akadémikus), illetve a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK) vezetőjének (Dr. Jenes Barnabás), hogy lehetőséget biztosítottak a munkámhoz.

Vizsgálataim az alábbi állami finanszírozású témákhoz kapcsolódtak: Jedlik Ányos program – OM 00026-00029 számú/2008-2011 (MONTABIO – témavezető Dr. Anton Attila), AD002 számú/2013-2015 VM pályázat (témavezető Dr. Fekete Gábor, ma Prof. Darvas Béla), AD006 számú/2013-2015 VM pályázat (témavezető Prof. Székács András), OTKA 91239 /2013-2016 (témavezető Prof. Székács András).

8. Irodalomjegyzék

- Abraxis LLC (2005): Bt-Cry1Ab/Cry1Ac. Warminster, PA, USA.
<http://www.abraxiskits.com/moreinfo/PN510001USER.pdf>
- Angsuthanansombat, C., Uawithya, P., Leetachewa, S., Pornwiroon, W., Ounjai, P., Kerdcharoen, T., Katzenmeier, G., Panyim, S. (2004): *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: Homology-based 3D model and implications for toxin activity. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37(3):304-313.
- Anonymous (1991): 91/414/EGK. (VII. 15.) A Tanács Irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról.
- Anonymous (2000): 44/2000. (XII. 27.) EüM rendelet a veszélyes anyagokkal és a veszélyes készítményekkel kapcsolatos egyes eljárások, illetve tevékenységek részletes szabályairól
- Anonymous (2004): 89/2004. (V. 15.) FVM rendelet a növényvédő szerek forgalomba hozatalának és felhasználásának engedélyezéséről, valamint a növényvédő szerek csomagolásáról, jelöléséről, tárolásáról és szállításáról
- Anonymous (2009): 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet a földtani közeg és a felszín alatti vízszennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről
- Ashby, J., Kier, L., Wilson, A.G.E., Green, T., Lefevre, P.A., Tinwell, H., Willis, G.A., Heydens, W.F., Clapp, M.J.L. (1996): Evaluation of the potential carcinogenicity and genetic toxicity to humans of the herbicide acetochlor. *Hum. Exp. Toxicol.* 15:702-735.
- Bakonyi, G., Szira, F., Kiss, I., Villányi, I., Seres, A., Székács, A. (2006): Preference tests with collembolas on isogenic and *Bt*-maize. *Eur. J. Soil Biol.* 42:132-135.
- Banks, K. E., Wood, S. H., Matthews, C., Thuesen, K. A. (2003): Joint acute toxicity of diazinon and copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Env. Toxicol. Chem.* 22:1562-1567.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Agra, A.R., Soares, A.M.V.M. (2007): Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquat. Toxicol.* 84:439-449.
- Barceló, D., Hennion, M.-C. (Eds.) (1997): Trace determination of pesticides and their degradation products in water, techniques and instrumentation in analytical chemistry, vol. 19, *Elsevier Science B.V.*, Amsterdam
- Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M., Sandtrom, M.W. (2005): Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002. *J. Amer. Water Resource. Assoc.*, 41:323-332.
- Becker, N., (2000): Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.F., Delecluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (Eds.): Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, p. 383.
- Beke J. (2002): Liofilezés (fagyasztva szárítás). In: Beke Gy. (szerk): Hűtőipari kézikönyv. Alapismeretek. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest, pp. 52-54.
- Beketov, M. A., Speranza, A., Liess, M. (2011): Ultraviolet radiation increases sensitivity to pesticides: synergistic effects on population growth rate of *Daphnia magna* at low concentrations. *Bull. of Environ. Contam. Toxicol.*, 87:231-237.

- Benachour, N., és Séralini, G.-E. (2009): Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 22(1):97-105.
- Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L. (2000): Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Reg. Tox. Pharmacol.* 32: 156-173.
- Bøhn, T., Traavik, T., Primicerio R. (2010): Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic *Bt*-maize. *Ecotoxicol.* 19:419- 430.
- Boldog V. (2013): Növényvédő szerek értékesítése. *Agrárgazdasági Kutatóintézet*, 18(1):3-5.
- Borah, D. K., Bera., M. (2003): Watershed-scale hydrologic and nonpoint-source pollution models: Review of mathematical bases. *Trans. ASAE* 46(6):1553-1566.
- Brausch, J., Beall, B., Smith, P. (2007): Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78:510–514.
- Bravo, A., Gill, S. J., Soberón. M. (2007): Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49: 423–435.
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J. (2006): Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. of the Nat. Acad. Sci. USA* 103:15196–15199.
- Butko, P. (2003): Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2415–2422.
- Byer, J. D., Struger, J., Klawunn, P., Todd, A., Sverko, E. (2008): Low cost monitoring of *glyphosate* in surface waters using the ELISA method: An evaluation. *Environ. Sci. Technol.* 42(16):6052– 6057.
- Carson, R. (1962): The Silent Spring. *Houghton Mifflin Co*, Boston.
- Cavalcante, D., Martinez, C., Sofia, S. (2008): Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Env. Mutagen.* 655(1): 41–46.
- Cavas, T., Konen, S. (2007): Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagen* 22(4):263–268.
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., Sorensen, H. (2008): A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 27:1621-1632.
- Chiou, C.T. (2002): Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. Hoboken, NJ, USA: *John Wiley és Sons*.
- Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P. (1996): Our Stolen Future. Dutton, New York. pp 1-316.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101(5): 378–384.
- Copping, L.G. (2001): Micro-organisms. In: Copping (ed.) Biopesticide Manual. *British Crop Protection Council*. pp. 36-38.
- Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D. (2011): Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest. Manag. Sci.* 68:16–30.

- Coviella, C.E., Stipanovic, R.D., Trumble, J.T. (2002): Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO₂ and nitrogen in transgenic cotton plants. *J. Exp. Bot.* 53:323–331.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H. (1998): Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
- Cuhra, M., Traavik, T., Bøhn, T. (2013): Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*, *Ecotoxicol.* 22:251–262.
- Darvas B. (1997): A genetikailag módosított élőszervezetek kibocsátásának környezeti kockázatai. *Fenntartható Fejlődési Bizottság*, Budapest. pp. 1–64.
- Darvas B. (1999a): A kémiai növényvédelem és kritikája. In: Polgár A.L. (szerk.): A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon. *OMFB*. pp. 15-48.
- Darvas B. (1999b): Genetikailag módosított élőszervezetek a növényvédelemben In: A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon. *OMFB*. pp. 85-91, pp. 212-218.
- Darvas B. (2000): Virágot Oikosnak. Kísértések kémiai és genetikai biztonságunk ürügyén. 1-430. *l'Harmattan*, Budapest. (ISBN 963 00 4741 1)
- Darvas B. (2006a): Bioakkumuláció és biomagnifikáció. In: Darvas B., Székács A. (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia *l'Harmattan*, Budapest, pp. 294-303.
- Darvas B. (2006b): A növényvédő szerek heveny toxicitása gerinceseken. In: Darvas B., Székács A. (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia *l'Harmattan*, Budapest, pp. 123-128.
- Darvas B., Bánáti H., Takács E., Vajda B., Neszlényi K., Székács A. (2011): Abs. I. *Ökotoxikológiai Konferencia* pp. 11-12. – <http://bdarvas.hu/download/pdf/AbsMOT4.pdf>
- Darvas B., Bokán K., Fejes Á., Maloschik E., Székács A. (2009a): Növényvédő szerek környezetanalitikai és ökotoxikológiai kockázatai. In: Németh A. (szerk.): Az ökológiai gazdálkodás szerepe a fenntartható fejlődésben. *Magyar Biokultúra Szövetség*, Budapest, pp. 11-17.
- Darvas B., Csóti A., Gharib, A., Peregovits L., Ronkay L., Lauber É., Polgár A. L. (2004): Adatok a Bt-kukoricapollen és védett lepkefajok lárváinak magyarországi rizikóanalíziséhez. *Növényvédelem*, 40 (9): 441-449.
- Darvas B., Kardos C., Székács A. (2013): Ízeltlábú kártevők ellen alkalmazott hatóanyagok Magyarországon 1962 és 2013 között. Abs. III. *Ökoroxikológiai Konferencia*, *Magyar Ökotoxikológiai Társaság*, Budapest, pp. 8-9.
- Darvas B., Lauber É. (2006): Genetikailag módosított szervezetek a növénytermesztésben. In: Darvas B., Székács A. (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia *l'Harmattan*, Budapest, pp. 315-319.
- Darvas B., Lauber É. (2007): A Cry1-toxinrezisztenciáról. In: Darvas B. (szerk.): Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. *Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága*, Budapest, pp. 64–66.
- Darvas B., Lauber É., Takács E., Székács A. (2009b): A GM-növények mérlege a növény és környezetvédelemben. I–II. *Környezetvédelem*, 17(1):24–25., 17(2):26-27.
- Darvas B., Lövei G. (2006): A genetikailag módosított szervezetek környezeti hatásai. In: Darvas B., Székács A. (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia *l'Harmattan*, Budapest, pp. 320–326.

- Darvas B., Székács A. (szerk.) (2006): Mezőgazdasági ökotoxikológia *l'Harmattan*, Budapest.
- Davies, C. (2005): Introduction to immunoassay principals. In: David Wild (ed.) The immunoassay handbook (The Third Edition) *Elsevier Ltd.*, pp. 3.-37.
- Delecluse, A., Barloy, F., Rosso, M.L. (1996): Les bacteries pathogenes des larves de dipteres: structure et specificite des toxines. *Ann. Inst. Pasteur, Actualites* 7(4):217-231.
- DeLorenzo, M.E.; Scott, G.I., Ross, P.E. (2001): Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:84–98
- Ding, X., and Henrichs, S.M. (2002): Adsorption and desorption of proteins and polyamino acids by clay minerals and marine sediments, *Marine Chem.* 77:225–237.
- Douville, M., Gagne, F., McKay, J., Masson, L., Blaise, C. (2005): Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in the environment. *Biochem. System Ecol.* 33:219–222.
- Eaton, R.C., Farley, R.D. (1974): Growth and reduction of dispensation of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia* 1:204-209.
- Edginton, A.N., Sheridan, P.M., Stephenson, G.R., Thompson, D.G., Boermans, H.J. (2004): Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:815–822 .
- Eljarrat, E., Barcelo, D. (2003): Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 22 (10): 655-665.
- Ensminger, L.E., Gieseking J.E. (1939): The adsorption of proteins by montmorillonitic clays. *Soil Sci.* 48:467–474.
- EnviroLogix QualiPlate™ Kit for Cry34Ab1
<http://www.envirollogix.com/library/ap054insert.pdf>
- Erdős, Gy., Szlobodnyik, J., Gálffy, Gy. (2001): Módszertani levél a szúnyogok elleni védekezésről. - EPINFO 9: 1-47.
- Európai Unió Bírósága, a Törvényszék Ítélete (2013. december 13.): Jogszabályok közelítése – GMO-k környezetbe történő szándékos kibocsátása – Forgalmahozatali engedélyezési eljárás – Az EFSA tudományos szakvéleményei – Komitológia – Szabályozási bizottsági eljárás – Lényeges eljárási szabályok megsértése – Hivatalból való figyelembevétel.
- European Commission (2006): Review report for the active substance diazinon. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.ViewReview&id=150.
- European Commission (2010): Review report for the active substance trifluralin. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=411
- European Council (1998): Council Directive 98/83/EC of 3rd November 1998. on the quality of water intended for human consumption, *Offic. J. Eur. Union L.* 330:32–54.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011): Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetochlor. *EFSA Journal* 9(5):2143.
- European Parliament and Council (2006): Directive 2006/118/EC (12 Dec 2006) on the protection of groundwater against pollution and deterioration. *Offic. J. Eur. Union L.* 372: 19-31.

- FAO Pesticide Disposal Series 8 (2003): Assessing soil contamination, a reference manual. Editing, design, graphics and desktop publishing: Editorial Group FAO Information Division
- FDA (2000) IV.C1. Short term tests for genetic toxicity. *In*: Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety of Food Ingredients
- Federici, B.A., Lüthy, P., Ibarra, J.E. (1990): Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Structure, protein composition, and toxicity. *In*: Barjac, de H., Sutherland, D. (eds): Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics and applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Rutgers Univ. Press*, New Brunswick, N J pp. 45-65.
- Ferreira, D., Costa da Motta, A., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V., Barcellos, L. (2010): Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79(9):914–921.
- Filip, Z. (1971): Clay minerals as a factor influencing the biochemical activity of soil microorganisms. *Folia Microbiol.* 18:56–74.
- Folmar, L.C., Sanders, J.O., Julin, A.M. (1979): Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8: 269–278.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., Wenzel, A. (2002): Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36:1429-1438.
- Füsti Molnár G. (2007): Az állami elismerés előtt lévő géntechnológiai úton módosított fajtákkal végzett hazai fajtavizsgálatok eredményei. *In*: Darvas B. (szerk.): Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. *Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága*, Budapest., pp. 17–19.
- Georgiou, G.P. and Wirth, M.C. (1997): Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *App. Environ. Microbiol.* 63:1095-1101.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000): Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167:35–120.
- Gill, S.S., Singh, G.J., Hornung, J.M., (1987): Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. *Infect. Immun.* 55:1300–1308.
- Goldberg, L.J. és Margalith, J. (1977): A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37:355-358.
- Griffiths, N.A., Tank, J.L., Royer, T.V., Rosi-Marshall, E.J., Whiles, M.R., Chambers, C.P., Frauen-dorf, T.C., and Evans-White, M.A. (2009): Rapid decomposition of maize detritus in agricultural headwater streams. *Ecol. Appl.* 19:133–142.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M. (2012): Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicol.* 21:1381–1390.

- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., és Soares, A. M. V. M. (2000): Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46:357-362.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V. (1977): Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Env. Sci. Tech.* 11:714-719.
- Hanke, I., Wittmer, I., Bischofberger, S., Stamm, Ch., Singer, H. (2010): Relevance of urban glyphosate use for surface water quality, *Chemosphere* 81:422–429.
- Harlow, E. és Lane, D. (1988): Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor, New York: *Cold Springs Harbor Laboratory*, pp. 344–348.
- Hayes, T.B., A. Collins, M. Lee, N. Mendoza, N. Noirega, A.A. Stuart, and A. Vonk. (2002): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:5477-5480.
- Hayes, T.B., K. Haston, M. Tsui, A. Hoang, C. Haeffele, and A. Vonk. (2003): Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 11:568-575.
- Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R., López-Guarnido, O. (2013): Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicol.* 307:136-145.
- Heszky L. (2006): Kell-e félnünk a transzgenikus növényektől? *Mag. Kutatás, Fejlesztés és Környezet* 2-3: 5-8.
- Heszky L. (2007): Génáramlás, génmegszökés várható következményei. In: Darvas B. (szerk.): Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. *Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága*, Budapest, pp. 20–23.
- Heszky L. (2008): A GMO kukorica hibridek termesztésének előnyei és hátrányai. *Agro napló* 4: 20-21.
- Heszky L. (2011): Géntranszfer technikák. *Agrofórum* 2:91-94.
- Hilbeck, A. és Schmidt, J.E.U. (2006): Another view on *Bt* proteins – How specific are they and what else might they do? *Biopestic. Int.* 2:1-50.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K. Veldhoen, N. (2004): Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:1928– 1938.
- Höfte, H. és Whiteley, H.R. (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Ibarra, J.E. és Federici, B.A. (1986): Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 165:527-533.
- ISAAA (2014): International service for acquisition of agri-biotech applications <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=85>
- ISO 6341:1996: Water quality- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test
- James, C. (2013): ISAAA Report on Global Status of Biotech/ GM Crops. *ISAAA Brief No. 46*. ISAAA: Ithaca, NY.

- Janssens L., Stoks R. (2013): Synergistic effects between pesticide stress and predator cues: conflicting results from life history and physiology in the damselfly *Enallagma cyathigerum*. *Aquatic Toxicol. Elsevier/North Holland Biomedical Press* 132-133:92-99.
- Jayawardene, U.A., Rajakaruna, R.S., Navaratne, A.N., Amerrasinghe, P.H. (2010): Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates crugiger*) in acute and chronic exposure. *Int. J. Agric. Biol.* 12:641–648.
- Jetten, V.G., De Roo, A.P.J., Favis-Mortlock, D. (1999): Evaluation of field-scale and catchment-scale soil erosion models. *Catena* 37:521-541.
- Jofré, D.M., García, M. J. G., Salcedo, R., Morales, M., Alvarez, M., Enriz, D., Giannini, F. (2013). Fish toxicity of commercial herbicides formulated with glyphosate. *J. Environ. Analyt. Toxicol.* 4(1):1–3.
- Johal, C.S. és Huber, D.M. (2009): Glyphosate effects on diseases of plants. *Eur. J. Agronomy* 31:144–152.
- Jones, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A. (2010): Competitive stress can make the herbicide Roundup more deadly to larval amphibians, *Environ. Toxicol. Chem.* 30:446–454.
- Károly G., Györfi L., Ocskó Z. (2001): Felszíni vizeink növényvédőszer-szennyezettségi vizsgálatai. *Növényvédelem* 37:539-545.
- Kelly, D.W., Poulin, R., Tompkins, D.M., Townsend, C.R. (2010): Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J. Appl. Ecol.* 47:498-504.
- Kimmel, C.B. Sepich, D.S., Trevarrow, B. (1988): Development of segmentation in zebrafish. *Development* 104:197-207.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203:253-310.
- Koskella, J., Stotzky, G. (1997): Microbial utilization of free and clay- bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3561–3568.
- Kovács, A. és Clement, A. (2008): Diffúz szennyezés modellezése vízgyűjtő léptékben: esettanulmány tapasztalatok, *Kézirat*, BME VKKT
- Kozlova, T., Wood, C.M., McGeer, J.C. (2009): The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the cladoceran *Daphnia pulex* and the development of a biotic ligand model. *Aquat. Toxicol.* 91:221-228.
- Kremmer T., Torkos K. (2010): A folyadékkromatográfia. In: Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata. *Akadémiai Kiadó*, Budapest pp.85-180.
- Kreuger, J. (1998): Pesticides in stream water within an agricultural catchment in Southern Sweden, 1990–1996, *Sci. Total Environ.* 216:227–251.
- Krisztalovics K., Bán E., Frenczi E., Zöldi V., Bakonyi T., Erdélyi K., Szalkai T., Csohán Á. és Szomor K. (2011): Nyugat-nílusi láz Magyarországon, 2010., *Epinfo* 18 (9-10):89-95.
- Laale, H.W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research.. A literature review. *J. Fish Biol.* 10(2):121–173.
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D., Scholz, N. L. (2009): The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered *Pacific salmon*. *Environ. Health Persp.* 117:348-353.

- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabana, M.C. (2010): Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione-S-transferase inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60:681–689.
- Lajmanovich, R.C., Sandoval, M.T., Peltzer, P.M. (2005): Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70:612–618.
- Lal, R. (1990): Soil erosion and land degradation: The global risks. In: Lal, R. and Stewart, B. (ed.): Soil degradation. Vol. 11 - Advances in Soil Science, New York: Springer-Verlag
- Lauber É., Polgár A.L. és Darvas B. (2007): A MON 810- és kukorica pollene és a védett lepkék.. In: Darvas B. (szerk.): Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest pp. 39–42.
- Le, H.M., Székács A., Tőkés G., Ferguson, B.S. (1996): Detection of atrazine in Hungary by immunoanalytical (ELISA) method. *J. Environ. Sci. Health* 30:459-464.
- Le, T.H.; Lim, E.S.; Lee, S.K.; Choi, Y.W.; Kim, Y.H. és Min, J. (2010): Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 79:67–71
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thiéry, I. (1999): Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86:660-672.
- Lee, L.-N., Saxena, D., Stotzky, G. (2003): Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4111–4115.
- Lilius, H., Hastbacka, T., Isomaa, B. (1995): A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:2085- 2088.
- Liška, I. és Slobodník, J. (1996): Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples, *J. Chromatogr.* 733:235–258.
- Lopez, D.E. és Carrascal, E. (1987): Sensitivity of human lymphocyte chromosome to diazinon at different times during cell culture. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38:125-130.
- Ludvigsen, G. H. és Lode, O. (2001): Results from the agricultural and environmental monitoring program of pesticides in Norway 1995–1999. *Fresenius Environ. Bull.* 10:470-474.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2009): Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76(7):932–937.
- Ma, W.T., Fu, K.K., Cai, Z., Jiang, G.B. (2003): Gas chromatography/mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters. *Chemosphere* 52:1627–1632.
- Magyarország Alaptörvénye, 2011
- Maier, K.J., és Knight, A.W. (1991): The toxicity of waterborne boron to *Daphnia magna* and *Chironomus decorus* and the effects of water hardness and sulfate on boron toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20:282-287.

- Majzik-Solymos E., Visi É., Károly G., Bercziné B.B., Győrfi L. (2001): Comparison of extraction methods to monitor pesticide residues in surface water. *J. Chrom. Sci.* 39:325-331.
- Maloschik E., Ernst A., Hegedűs Gy., Darvas B., Székács, A. (2007): Monitoring water-polluting pesticides in Hungary. *Microchem. J.* 85:88-97.
- Mann, R.M. és Bidwell, J.R. (1999): The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36:193-199.
- Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R., Mulner- Lorillon, O. (2005): A glyphosate-based pesticide impinges on transcription, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203:1-8.
- Margalith, Y. és Ben-Dov, E. (2000): Biological Control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In: Margalith, Y., Ben-Dov, E., Rechcigl, J.E., Rechcigl, N.A. (ed.): Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection, *CRC Press*, Boca Raton, p. 243
- Marth P.; Karkalik A. (2004): A Talajvédelmi Információs és Monitoring (TIM) rendszer módszertana, működése, informatikai rendszere. *Kézirat*. Budapest p.29.
- Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V. (2007): Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ. Internat.* 33:414-425.
- Mazanti, L., Sparling, D.W., Rice, C., Bialek, K., Steveson, C., Teels, B. (2003): Synergistic effects of a combined exposure herbicides and an insecticide in *Hyla versicolor*. In: Linder, G., Krest, S., Sparling, D., Little, E. (eds): Multiple stressor effects in relation declining amphibian populations ASTM STP, 1443, West Conshohocken (PA) American Society for Testing and Materials.
- McLaughlin, A., és Mineau, P. (1995): The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agricult. Ecosyst. Environ.* 55:201-212.
- Meisner, L.F. Belluck, D.A., Roloff, B.D. (1992): Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine "in vivo" and "in vitro". *Environ Mol Mutagen* 19:77-82.
- Mendelson, M., Kough, J., Vaituzis, Z., Matthews, K. (2003): Are *Bt* crops safe? *Nat Biotechnol* 21:1003–1009.
- Modesto, K.A., Martinez, C.u.B. (2010): Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3):294–299.
- Monsanto Company (1998): Roundup® Original. Biztonsági adatlap (Material Safety Data Sheet), St. Louis, MO, USA: Monsanto Co.
- Monsanto Company (2012): Roundup® Classic. Biztonsági adatlap (Material Safety Data Sheet), St. Louis, MO, USA: Monsanto Co.
- Moorman, T.B., Keller, K.E. (1996): Crop resistance to herbicides: effects on soil and water quality, In: S.O. Duke (ed.): Herbicide-resistant Crops—Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects, *Lewis Publisher*, London pp. 283–302.
- Morozova, V.S., Levashova, A.I., Eremin, S.A. (2005): Determination of pesticides by enzyme immunoassay. *J Anal Chem* 60(3):202-217.
- Mörthl M., Németh G., Juracsek J., Darvas B., Kamp, L., Rubio, F., Székács A. (2013): Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchem J* 107:143–151.

- MSZ 21464:1998: Mintavétel a felszín alatti vizekből.
- MSZ 21470/1-80: Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mintavétel.
- MSZ EN ISO 5667-2:1993: Vízminavétel. A mintavételi technikák előírásai.
- MSZ ISO 10706:2002: Vízminőség. Anyagok hosszú távú mérgező hatásának meghatározása *Daphnia magna* Straus-on (Cladocera, Crustacea).
- Murnik, M.R. és Nash, C.L. (1977): Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster*. *J Toxicol Environ Health* 3:691-697.
- Murnik, M.R. (1978): Mutagenicity of the herbicide trifluralin in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 53:235-236.
- Müller, K., Magesan, G.N., Bolan, N.S. (2007): A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agricult Ecosyst Environ* 120(2-4):93-116.
- Nebeker, A.V., Cairns, M.A., Onjukka, S.T., Titus, R.H. (1986): Effect of age on sensitivity of *Daphnia magna* to cadmium, copper and cyanazine. *Environ Toxicol Chem* 5(6):527-530.
- NÉBIH (2012): 2012. évi szerforgalmi jelentés, Budapest http://www.nebih.gov.hu/data/cms/161/793/2012_evi_publikus_szerforgalmi_jelentes.pdf
- Nehéz M., Páldy, A., Selyes, A., Körösfalvi, M., Lörinczi, I., Berencsi, G. (1979): The mutagenic effect of trifluralin-containing herbicide on mouse bone marrow in vivo. *Ecotoxicol Environ Saf* 3:454-457.
- Németh, Gy. és Székács, A. (2012): Comparison of the legal regulations of pesticides and hazardous chemicals in the European Union with emphasis on genotoxic and endocrine disrupting effects. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 47(2):251-274.
- Nerin, C., Martinez, M., Cacho, J. (1991): Distribution of hexachlorocyclohexane isomers from several sources. *Toxicol Environ Chem* 35:125-135.
- Nowell, L.H., Capel, P.D., Dileanis, P.D. (1999): Pesticides in stream sediment and aquatic biota-Distribution, trends, and governing factors: Boca Raton, Fla., *CRC Press*, Pesticides in the Hydrologic System series, 4:10-40.
- OECD Test No. 202 (2004):OECD guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, pp. 1-12.
- OECD Test No. 211 (2012):OECD guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia magna* Reproduction Test, pp. 1-25.
- OECD Test No. 236 (2013): OECD guidelines for the testing of chemicals - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, pp. 1-22.
- Oestergaard, J., Voss, S., Lange, H., Lemke, H., Strauch, O., and Ehlers, R.-U. (2007): Quality control of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* products based on toxin quantification with monoclonal antibodies. *Biocontrol Sci Technol* 17:295-302.
- Oldal B., Maloschik E., Uzinger N., Anton A., Székács A. (2006): Pesticide residues in Hungarian soils. *Geoderma* 135:163-178.
- Osano, O., Admiraal, W., Otieno, D. (2002): Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:375-379.

- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., Carrasco, A. E. (2010): Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retionic acid signaling. *Chem Res Toxicol* 23:1586–1595.
- Pagel-Wieder, S., Gessler, F., Niemeyer, J., Schröder, D. (2004): Adsorption of the *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) on Na-montmorillonite and on the clay fractions of different soils. *J Plant Nutr Sci* 167:184-188.
- Palumbi, S.R. (2001): Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 293:1786–1790.
- Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., David, J.-P. (2011): Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Man Sci* 67(1):122-8.
- Pedersen, F. és Petersen, G.I. (1996): Variability of species sensitivity to complex mixtures. *Water Sci Technol* 33:109-119.
- Perez, C., Fernandez, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberon, M., Bravo, A. (2005): *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc NAT Acad Sci USA* 102:18303-18308.
- Pérez, G.L., Solange Vera, M., Miranda, L.A. (2012): Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: Hasaneen, M.N.A E.-G. (ed.): Herbicides – properties, synthesis and control of weeds, Rijeka, Croatia: *InTech* pp. 334–368.
- Perkins, P.J., Boermans, H.J., Stephenson, G.R. (2000): Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay – Xenopus. *Environ Toxicol Chem* 19:940–945.
- Pethő Á. és Griff T. (2012): Az Európai unióban használt növényvédő szer hatóanyagok engedélyezésében bekövetkezett változások. Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság, Budapest.
- Pinck, L.A. (1962): Adsorption of proteins, enzymes and antibiotics by montmorillonite. *Clay and Clay Minerals* 9:520–529.
- Polgár A.L. (2006): A növényvédő szerek heveny toxicitása. In: Darvas B., Székács A., (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. *l'Harmattan*, Budapest pp. 117-122.
- Polgár A.L., Schmera D. (2006): Toxicitás alacsonyabb rendű hasznos élő szervezeteken. In: Darvas B., Székács A., (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. *l'Harmattan*, Budapest, pp. 129-134.
- Priest, F.G. (1992): Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol* 72:357-369.
- Pusztai Á. és Bardócz Zs. (2006): Genetikailag módosított élelmiszerek táplálkozási hatásai. In: Darvas B., Székács A., (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. *l'Harmattan*, Budapest, pp. 327–333.
- Qaim, M., Zilberman, D. (2003): Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science* 299:900–902.
- Relyea, R. és Hoverman, J. (2006): Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems, *Ecol Letters* 9:1157–1171.
- Relyea, R.A. (2005): The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol* 48:351–357.

- Relyea, R.A. (2009): A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159:363–376.
- Relyea, R.A. és Jones, D.K. (2009): The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. *Environ Toxicol Chem* 28:2004–2008.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G.-E. (2005): Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Persp* 113(6):716–720.
- Rico-Martínez, R., Arias-Almeida, J.C., Pérez-Legaspi, I.A., Alvarado- Flores, J. és Retes-Pruneda, J.L. (2012): Adverse effects of herbicides on freshwater zooplankton. *In*: Hasaneen, M.N.A E.-G. (ed.): Herbicides – properties, synthesis and control of weeds, Rijeka, Croatia. *InTech* pp. 405– 434.
- Ritchie, W.W., Hanway J.J., Benson, G.O. (1992): How a corn plant develops. Special Report 48. *Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service*, Ames, IA, USA.
- Rodrigues, S.M., Pereira, M.E., Ferreira da Silva, E., Hursthouse, A.S., Duarte, A.C. (2009): A review of regulatory decisions for environmental protection: Part I – Challenges in the implementation of national soil policies. *Environ Intern* 35:202-213.
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li M.S., Jin, B.R., Je, Y.H. (2007): *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotech* 17:547–559.
- Rohr, J.R., and K. McCoy. (2010). A qualitative metal analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environ. Health Perspect.* 118:20-32.
- Rohr, J.R., és P.W. Crumrine (2005): Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecol Appl* 15:1135–1147.
- Romeis, J., Hellmich, R.L., Candolfi, M.P., Carstens, K., De Schrijver, A., Gatehouse, A.M., Herman, R.A., Huesing, J.E., McLean, M.A., Raybould, A., Shelton, A.M., Waggoner, A. (2011): Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. *Transgenic Res* 20:1-22.
- Rosi-Marshall, E.J., Tank, J.L., Royer, T.V., Whiles, M.R., Evans-White, M., Chambers, C., Griffiths, N.A., Pokelsek, J., Stephen. M.L. (2007): Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proc of the Nat Acad Sci USA* 104:16204–16208.
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., del Carmen Tortorelli, M. (1997): Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth, *Bull Environ Contam Toxicol* 59:638–644.
- Sandbacka, M., Christianson, I., Isomaa, B. (2000): The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish - A comparative study, *Toxicol In Vitro* 14:61–68.
- Sandrini, J.Z., Rola, R.C., Lopes, F.M., Buffon, H.F., Freitas, M.M., Martins, de M.G. és da Rosa, C.E. (2013): Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the *Mussel perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*. *In vitro studies, Aquatic Toxicol* 130–131:171–173.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998): *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775-806.

- Scourfield, D.J. és Harding, J.P. (1958): A key to the British species of freshwater Cladocera with notes on their ecology. *Fresh Biol Assoc Scientific Publication* 5, Ambleside, Westmorland.
- Seiber, J.N. (2002): Environmental fate of pesticides, *In*: Wheeler, W.B. (edit.): Pesticides in agriculture and the environment, *Dekker: New York, USA*, pp.127-162.
- Solecki, R., Davies, L., Dellarco, V., Dewhurst, I., van Raaij, M., Tritscher, A. (2005): Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides. *Food Chem Toxicol* 43:1569-1593.
- Solomon, K.R., Carr, J.A., DuPreez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., VanderKraak, G.J. (2008): Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38:721-772.
- Stalikas, C.D. és Konidari, C.N. (2001): Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A* 907:1–19.
- Staples, C.A, Adams, W.J., Parkerton, T.F., Gorsuch, J.W., Biddinger, G.R., Reinert, K.H., (1997): Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. *Environ Toxicol Chem* 16:875- 891.
- Strigul, N., Vaccari, L., Galdun, C., Wazne, M., Liu, X., Christodoulatos, C., Jasinkiewicz, K. (2009): Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination* 248:771-782.
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., Marvin, C. (2008): Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bull Environ Contam Toxicol* 80(4)378–384.
- Swan, C.M., Jensen, P.D., Dively, G.P., Lamp, W.O. (2009): Processing of transgenic crop residues in stream ecosystems. *J Appl Ecol* 46:1304–1313.
- Székács A. és Darvas B. (2007): A *MON 810*-es kukorica Cry1-toxin termelése és annak tarlómaradványokban való bomlása. *In*: Darvas B. (szerk.): Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. *Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága*, Budapest pp. 27-30.
- Székács A. és Darvas B. (2012a): Comparative aspects of Cry toxin usage in insect control. *In*: Ishaaya, I., Palli, S. R. , Horowitz, R. (eds.): Advanced technologies for managing insect pests, Berlin, Springer-Verlag, pp. 195-230.
- Székács A. és Darvas B. (2012b): Forty years with glyphosate, herbicides. *In*: Hasaneen, M.N.A E.-G. (ed.): Herbicides – properties, synthesis and control of weeds, Rijeka, Croatia: *InTech* pp. 247-284.
- Székács A., Maloschik E., Mörtl M., Darvas B. (2008): Talajaink és vizeink növényvédőszer-szennyezettsége. *Környezetvédelem* 16(6):14-15.
- Székács, A. (2006): A növényvédő szerek felosztása és hatásmechanizmusa. *In*: Darvas B., Székács A. (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. *l'Harmattan*, Budapest. pp. 65-112.
- Takács E., Lauber É., Bánáti H., Székács A., Darvas B. (2009): *Bt*-növények a növényvédelemben. *Növényvédelem* 45:549-558.
- Takács, E., Fónagy, A., Juracsek, J., Kugler, N., Székács, A. (2012): Characterisation of tritrophic effects of DAS-59122-7 maize on the seven-spotted ladybird (*Coccinella septempunctata*) feeding on the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). 73:121–134.
- Talwar, P.K. és Jhingran, A.G. (1991): Inland fishes of India and adjacent countries - Vol. I, *Oxford és IBH Publishing Co. Pvt. Ltd*, New Delhi, p. 541.

- Tank, J.L., Rosi_Marshall, E.J., Royer, T.V., Whiles, M.R., Griffiths, N.A., Frauendorf, T.C., Treering, D.J. (2010): Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (CryIab) within the stream network of an agricultural landscape, *Proc Natl Acad Sci* 107:17645–17650.
- Tapp, H. és Stotzky, G. (1998): Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol Biochem* 30:471–476.
- Thomas, W.E. és Ellar, D.J. (1983): Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *FEBS Lett* 154:362- 368.
- Thompson, D.G., Wojtaszek, B.F., Staznik, B., Chartrand, D.T., Stephenson, G.R. (2004): Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environ Toxicol Chem* 23:843–849.
- Tijssen, P. (1985): Practice and theory of enzyme immunoassays. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Vol. 15), *Amsterdam: Elsevier Biomedical Press*.
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R.A, Gury, J. (2008): Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS One* 3(10):34-32.
- Tomlin. C.D.S., (ed.) (2000): The Pesticide Manual, 12th Ed., *British Crop Protection Council*, Farnham, UK, pp. 5-966.
- Tóth S. (2009): A Mátta-vidék csípőszűnyog-faunája (Diptera: Culicidae). *Fol Hist Nat Mus Matr Suppl* 4:1–136.
- Tripathy, N.K., Broutray, P.K., Sahu, G.P., Anandkumar, A. (1993): Atrazine, a triazine herbicide, is genotoxic in the *Drosophila* somatic and germ line cells. *Biol Zentbl* 112(3): 312-318.
- Tsui, M.T.K. és Chu, L.M. (2003): Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:1189–1197.
- Tu, M., Hurd, C., Randall, J.M. (2001): Weed Control Methods Handbook, *The Nature Conservancy*, Davis, CA, USA, p. 74.
- U.S. Department of Agriculture (USDA) (1984): Herbicide background statement: glyphosate. Pesticide Background Statements. Vol. 1. Herbicides. *Agricultural Handbook* 633:1-72.
- United Nations (2001): Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *United Nations Environment Programme*, Geneva, Switzerland
- US EPA (2003): Memorandum - Metolachlor. HED Records Center Series 361 Science Reviews - File R059866 http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-108801_12-Feb-03_a.pdf
- Vágó Sz. (2013): OMÉK NMKSZE szakmai nap, Budapest - A magyar növénytermesztés input anyag forgalma és a disztribúció csatornái - előadás, Agrárgazdasági Kutatóintézet.
- van der Geest, H. G., Greve, G. D., Boivin, M. E., Kraak, M. H.S., van Gestel, C.A.M. (2000): Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. *Environ Toxicol Chem* 19:2900-2905.
- van Frankenhuyzen, K. (2009): Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J Invertebr Pathol* 101:1-16.

- Várnagy L. (1995): A növényvédelmi higiénia gyakorlati alapjai. In: Várnagy L., Budai P. (szerk.): Agrárkémiai higiénia. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp.108-202.
- Vereecken, H. (2005): Mobility and leaching of the glyphosate: a review. *Pest Manag Sci* 61: 1139–1151.
- Vétek G., Nagy G. (2011): Kártevők a kertben. Károsítók azonosítása és a védekezés lehetőségei. *Cser Kiadó*, Budapest. pp. 10-15.
- Viktorov, A.G. (2011): Transfer of *Bt* corn byproducts from terrestrial to stream ecosystems. *Russian J Plant Phys* 58(4):543-548.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A.L.J., Melillo, J.M (1997): Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277:494–499.
- Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A. (1999): Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat Res* 437:21–49.
- Webster, T.M.U., Laing, L.V, Florance, H., Santos, E.M. (2014): Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 48:1271-1279.
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011): Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicol* 281(1-3):25–36.
- WHO (2007): Specifications and evaluations for public health pesticides; *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strain AM65-52, Geneva: *World Health Organization*.
- Womack, M. (1993): The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Wing Beats* 5(4):4.
- Woodburn, A.T. (2000): Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Man Sci* 56:309-312.
- Zhang W., Crickmore N., George Z., Xie L., He Y.Q., Li Y., Tang J.L., Tian L., Wang X., Fang X.J. (2012): Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*-an alternative to *Bti*? *J Invertebr Pathol* 109(2):217-222.
- Zobiole, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira, Jr.R.S., Constantin, J. (2011): Glyphosate affects microorganisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybean. *J Appl Microbiol* 110: 118-127.
- Zöldi V., Fekete G., Darvas B. (2005): Szelektív hatású lárváölő készítmények összehasonlító vizsgálata *Aedes aegypti* Linnaeus és *Culex pipiens* Linnaeus csípőszúnyog (Culicidae) fajokon. *Acta Biol Debr Oecol Hung* 13:259-267.
- Zöldi V., Papp K. (2013): A 2012. évi szervezett csípőszúnyog-gyérítés adatai. *Kártevőirtás* 20(1):5-6.

9. Új tudományos eredmények

1. Hazai, eltérő művelésű földterületekről származó talaj- és vízmintákban növényvédőszer-maradékok és szennyező toxikus elemek előfordulását és azok hatásait vízi gerincteleneken vizsgálva megállapítottam, hogy az egyenkénti hatásokhoz képest a komplex mintákban eltérő toxicitás mérhető *Daphnia magna* tesztállaton. A vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a Magyarországon alkalmazott talajmonitorozó rendszer nem elegendő a környezetbe kijuttatott anyagok különböző kombinációi együttes hatásának feltárásához, ahhoz komplex környezeti minták vizsgálata is szükséges lehet, mely ötvözi az analitikai és biológiai eljárásokat.

2. Egy *glyphosate* tartalmú herbicid hatóanyagának, formázóanyagának (POEA) és formulált készítményének (Roundup Classic) hatását különböző eredetű *Daphnia magna*-törzseken (vad- és laboratóriumi standard típus) vizsgálva LC_{50} -értékeket állapítottam meg, és eltérő érzékenységet mutattam ki a törzsek között. A toxicitás mértéke a két törzsre a következőképpen alakult: *glyphosate* (360, ill. 900 mg/l) $\ll$ Roundup Classic (18,7, ill. 20,6 mg/l) $<$ POEA (1,28, ill. 3,3 mg/l).

3. Először mutattam ki a POEA formázóanyag teratogén hatásait *Danio rerio* embriókon. A *Daphnia magna* eredményekhez hasonlóan a toxicitás mértéke zebradánió-embriókon a következőképpen alakult: *glyphosate* (> 9750 mg/l) $\ll$ Roundup Classic (90 mg/l) $<$ POEA (5 mg/l). Az LC_{50} -értékek mellett szubletális hatásként a vizsgált anyagok főként vérkeringési zavarokat, fejet érintő deformitásokat és a szívritmus gátlását okozták.

4. Megállapítottam, hogy transzgenikus *Bt*-kukorica (*MON 810* és *DAS 59122-7*) tarlómaradványainak toxintartalma felszíni élővizeket tartalmazó akváriumokban az első 24 óra alatt csökkent drasztikusan ($>80\%$ -kal), majd lassabb ütemben folytatódott a továbbiakban. A toxinok vízből nem voltak kimutathatóak.

5. Transzgenikus *Bt*-kukorica (*MON 810* és *DAS 59122-7*) tarlómaradványai vizsgálatokkor kimutattam, hogy azok akut hatásokat nem okoztak *Daphnia magna* és *Aedes aegypti* tesztállatokon. Krónikus vizsgálatokban a kukoricával táplált *D. magna*-anyák pusztulása szignifikánsan nagyobb volt a kontrollnál, viszont a transz- és izogénes vonalak

között nem volt különbség. A legnagyobb utódszám a kontrollnál volt megfigyelhető, azonban a transz- és izogenikus kukoricaváltozatok közötti különbség statisztikailag nem volt igazolható. Megállapítottam, hogy a kísérleti rendszer fejlesztésre szorul, hogy a toxin hatása elválasztható legyen az eltérő táplálék hatásától.

6. Először alkalmaztunk hazai felszíni vizekben Cry4-toxintartalmú készítmények lebomlásának és hatástartamának vizsgálatára saját fejlesztésű ELISA rendszert. Megállapítottuk a kimutatási határt a granulátum és a folyadék készítményekre (170 ill. 900 ng/ml). A toxin koncentrációja az eltelt napok függvényében csökkent, a DT_{50} értéke a Velencei-tó, Hévíz és a Körös vizét tartalmazó akváriumokban rendre 3,8; 4,5 és 5,5 nap. A szúnyoglárvák mortalitási tesztjének eredményei eltérően alakultak a különböző helyekről származó akváriumai vizekben, erős függést mutatva a szervesanyag-tartalomtól. Megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas a toxin kimutatására, de környezeti minták értékeléséhez további fejlesztésre szorul.

10. New scientific results

1. The occurrence and toxic effects of pesticide residues and contaminating microelements that originated from samples of cultivated land were examined, as part of a complex soil monitoring project. It was concluded, for contaminants observed on *Daphnia magna*, that the toxicities of single contaminants differ from those of complex environmental samples. According to our experiments, the recent Hungarian Soil Monitoring System is insufficient for evaluation of the effects of complex environmental samples. Therefore, in order to detect the effect of the different combinations of contaminants in soil and water samples, a combination of analytical and biological methods is necessary.

2. Effects of a glyphosate based herbicide (ROUNDUP CLASSIC), its active ingredient glyphosate IPA-salt and its formulating agent (POEA) on different populations (laboratory and wild type) of *D. magna* were firstly examined. LC_{50} values were determined and variant sensitivity of different population was showed. According to the mortality tests, the toxicity values were as follows: glyphosate (360 and 900 mg/l) $\ll$ ROUNDUP CLASSIC (18,7 and 20,6 mg/l) $<$ POEA (1,28 and 3,3 mg/l).

3. Teratogenic effects of POEA formulating agent were firstly determined on *Danio rerio* embryos. Similarly to results on *D. magna*, the toxicity values were as follows: glyphosate (> 9750 mg/l) $\ll$ ROUNDUP CLASSIC (90 mg/l) $<$ POEA (5 mg/l). Besides LC_{50} values, in sublethal concentrations mainly head deformations, inhibition of heartbeat and blood circulation were detected.

4. I concluded that the toxin content of transgenic *Bt*-corn stubble (*MON 810* and *DAS 59122-7*) in aquaria containing freshwater from environmental habitats was decreased dramatically (more than 80%) within the first 24 hours, and it continued to diminish at a lower rate afterwards. Cry1- and Cry3-toxins could not be detected in water.

5. No acute effects of transgenic *Bt*-corn stubble (*MON 810* and *DAS 59122-7*) were exerted on *D. magna* and *Ae. aegypti*, although in chronic tests the mortality on adult water flea fed with corn was significantly higher than in the control group. Significant differences between transgenic and isogenic corn lines were not observed. The highest number of

offspring was detected in the control group; nevertheless there was no difference between transgenic and isogenic corn lines. I concluded that this experimental design needs to be improved in order to distinguish the effect of the toxin from the effects of food types.

6. For the first time in the case of Hungarian surface waters, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the detection of the effect of duration and degradation of Cry4-toxin. The practical LODs for *Bti* preparations VECTOBAC WDG granulate ($\sim 170 \text{ ng ml}^{-1}$) and VECTOBAC 12AS suspension ($\sim 900 \text{ ng ml}^{-1}$) were determined. The DT_{50} of toxin – in case of VECTOBAC WDG – in surface water from Velence, Hévíz and Körös was found respectively to be: $3,8 \pm 0,3$; $4,5 \pm 0,6$; $5,5 \pm 1,5$ days. The results of mosquito-larvae test vary in different water samples, showing a high dependence upon organic matter content. It can be concluded that this method is suitable for detecting Cry4-toxin, but the sensitivity in the case of environmental samples needs to be developed further.

Függelék

Publikációs lista

Az értekezés témakörében

Idegen nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Á. Fejes, E. Takács, G. Fekete, B. Darvas, B. S. Ferguson, D. Saxena and A. Székács (2012): Aquatic effect duration and degradation study of Cry4 toxin with immunoassay and *Aedes aegypti* larval biotest. *Aquatic Insects*, 34 (Suppl. 1): 211–226. IF: 0,496

A. Székács, M. Mörtl, G. Fekete, **Á. Fejes**, B. Darvas, M. Dombos, O. Szécsy and A. Anton (2014): Monitoring and biological evaluation of surface water and soil micropollutants in Hungary. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 9 (3): 47-60 IF: 1,171*

I. Székács, **Á. Fejes**, Sz. Klátyik, E. Takács, D. Patkó, J. Pomóthy, M. Mörtl, R. Horváth, E. Madarász, B. Darvas, A. Székács (2014) Environmental and toxicological impacts of glyphosate with its formulating adjuvant. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8 (3): 213-218.

Magyar nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Fejes Á., Bokán K., Maloschik E. és Fekete G. (2009): Talajvízminták növényvédő szer maradékai és biológiai értékelésük nagy vízibolhán (*Daphnia magna*). *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 20:79-86.

Darvas B., Bokán K., **Fejes Á.**, Maloschik E., Székács A. (2009): Növényvédő szerek környezetalitikai és ökotoxikológiai kockázatai. In.: Németh A. (szerk.): Természetvédelem és ökológiai gazdálkodás. Budapest, *Magyar Biokultúra Szövetség* pp. 11-17.

* 2014-es közlemény esetében a folyóirat elmúlt 5 éve impakt faktorainak átlagával számolva.

- Takács E., **Fejes Á.**, Fekete G., Darvas B., Székács A. (2010): Cry4 toxin hatóanyag vízi hatástartam- és lebomlásvizsgálata *immunoassay* és *Aedes aegypti* lárvateszt segítségével, *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 21:223.-232.
- Darvas B., **Fejes Á.**, Mörtl M., Bokán K., Bánáti H., Fekete G. és Székács A. (2011): A *glyphosate* alkalmazásának környezet-egészségügyi problémái. *Növényvédelem*, 47: 387-401.
- Fekete G., **Fejes Á.**, Székács A., Mörtl M., Zöldi V., Reisinger M., Darvas B. (2011): Csípőszúnyogok elleni védekezés Magyarországon. *Növényvédelem* 47(5):195-203. 10

Konferenciakiadványban megjelent közlemények idegen nyelven

- Székács A., **Fejes Á.**, Fekete G., Takács E., Nádasy M., Darvas B. and Anton A. (2010): Aquatic arthropod biotests for environmental surveys, p. 93. In. *Abs. IXth European Congress of Entomology*, Budapest

Konferenciakiadványban megjelent közlemények magyar nyelven

- Fejes Á.**, Fekete G., Székács A. és Darvas B. (2010): Cry-toxin tartalmú kukoricapollen (MON 810 és DAS-59122) és néhány vízi szervezet (*Aedes aegypti*, *Daphnia magna*) kölcsönhatása. p. 61. In. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok, III. Géntechnológia- Növény-és Környezetvédelem Szimpózium*, Budapest
- Székács A., **Fejes Á.**, Mörtl M., Bokán K., Bánáti H., Fekete G. és Darvas B. (2011): A *glyphosate* környezet-egészségügyi hatásai. pp. 24-25. In: Darvas B. (szerk.) *Abs. I. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia*, Budapest
- Mörtl M., **Fejes Á.**, Bokán K., Darvas B. és Székács A. (2011): A hazai növényvédő szer eredetű vízszennyezők és előfordulásaik környezeti mintákban. p.19 In: Darvas B. (szerk.) *Abs. I. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia*, Budapest
- Fejes Á.**, Takács E., Juracsek J., Klátyik Sz., Fekete G., Székács A. és Darvas B. (2012): Cry-toxin tartalmú kukoricák vízben való lebomlásának vizsgálata és toxikológiai értékelése. pp. 11-12. In. Darvas B. (szerk.) *Abs. II. Ökotoxikológiai konferencia*, Budapest

Egyéb közlemények

- Bokán K., **Fejes Á.**, Soós I., Fekete G. és Darvas B. (2009): Mutagenitási tesztek és egyes növényvédő szerek mutagén mellékhatásai. *Növényvédelem* 45:497-504. 12
- Bokan, K., **Fejes, A.**, Fekete, G. (2010): Application of the Smart mutagenicity test and an aquatic toxicity biotest on pesticides as environmental stressors. *Növénytermelés* 59:(Suppl.) pp.187-190.
- Mörzl M., Juracsekné Nádasdi J., Cseresnyés E., Fekete G., **Fejes Á.**, Kereki O. és Székács A. (2013): Neonikotinoid csávázószer megjelenése a kukorica guttációs folyadékában. pp. 22-23. In. Darvas B. (szerk.) Abs. III. *Ökotoxikológiai konferencia*, Budapest
- Takács E., Darvas B., **Fejes Á.**, N. Defarge, G-É. Séralini és Székács A. (2013): Többszörös kölcsönhatások növényvédőszer-hatóanyagok és formázási segédanyag között: a *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag, a formulálására alkalmazott polietoxilált faggyúaminok és a Cry1Ab-toxinfehérje kombinált citotoxikus hatásai. pp. 39-40. In. Darvas B. (szerk.) Abs. III. *Ökotoxikológiai konferencia*, Budapest
- Takács E., **Fejes Á.**, Klátyik Sz., Szántai-Kis Cs., Darvas B. and Székács A. (2014): Comparative toxicity assessment of a herbicide active ingredient with its formulating adjuvants on human cell lines. Abs. p.23. In: *Korean – Hungarian Workshop on Joint Research for Global Food Security: Ensuring Environmental and Food Safety*, Budapest
- Darvas B., Füleki L., Bánáti H., Klátyik Sz., **Fejes Á.** és Székács A. (2014): A géntechnológiai úton módosított növények engedélyezése - az egyes országok stratégiái. pp. 8-10. In: Darvas B. (szerk.) Abs. IV. *Ökotoxikológiai konferencia*, Budapest