

Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola



DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DOI:10.18136/PE.2019.727

A kagyló mikronukleusz teszt alkalmazhatóságának vizsgálata vízszennyező komponensek genotoxicitás minősítésében

Készítette:

Eck-Varanka Bettina

Környezettudományi Intézet, Limnológia Tanszék

Témavezető:

Dr. Kováts Nóra, *egyetemi docens*

Környezettudományi Intézet, Limnológia Tanszék

Pannon Egyetem, Veszprém
2019

A kagyló mikronukleusz teszt alkalmazhatóságának vizsgálata vízszennyező komponensek genotoxicitás minősítésében

Értekezés doktori (Ph.D.) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

Eck-Varanka Bettina

Készült a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezetők: **Dr. Kováts Nóra**
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.

Veszprém,

.....
A Bíráló Bizottság elnöke

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

.....
Az EDHT elnöke

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	5
Abstract	6
Auszug.....	7
Bevezetés.....	8
1. Irodalmi áttekintés.....	9
1.1. Tesztszervezetek bemutatása	9
1.2. A kagylók, mint tesztalanyok	10
1.3. Kagylótesztekben alkalmazott fajok.....	10
1.3.1. <i>Unionoida</i>	10
1.3.2. <i>Veneroida</i>	17
1.4. A kagylótesztek végpontjai	18
1.4.1. Mortalitás	18
1.4.2. Növekedés	18
1.4.3. Viselkedés és morfológia	19
1.4.4. Akkumuláció	20
1.4.5. Biokémiai és immunmarkerek	21
1.5. <i>In situ</i> és <i>ex situ</i> vizsgálatok	22
1.6. DNS károsodás fajtái és kimutatása	25
1.6.1. Genotoxicitás.....	25
1.6.2. DNS károsodás formái	26
1.6.3. Mikronukleusz teszt	29
Célkitűzések	32
2. Anyagok és módszerek.....	34
2.1. Mikronukleusz teszt.....	34
2.1.1. Kagylók gyűjtése és tartása	34
2.1.2. Kezelés	35

2.1.3.	Hemolimfa gyűjtése és fixálása.....	36
2.1.4.	Festés és fotózás	38
2.1.5.	Mikronukleuszok azonosítása és számolás	38
2.1.6.	Statisztika	39
2.2.	Összehasonlító tesztek.....	40
2.3.	Vizsgálatok	41
2.3.1.	Egykomponensű minták vizsgálata.....	41
2.3.2.	Környezeti minták vizsgálata	42
2.3.3.	<i>In situ</i> vizsgálatok.....	47
3.	Eredmények és kiértékelésük	48
3.1.	Egykomponensű minták vizsgálata	48
3.1.1.	Rézsulfát	48
3.1.2.	Benzapirén.....	52
3.2.	Környezeti minták vizsgálata	57
3.2.1.	Allelopatikus növények és tannin	57
3.2.2.	Szennyvíz	61
3.2.3.	Biodízel	66
3.3.	Balatoni <i>In situ</i> kísérlet.....	67
4.	Konklúziók és összefoglalás	70
	Tézispontok	72
	Theses.....	73
	Irodalomjegyzék.....	74

Kivonat

A környezetben található genotoxikus anyagok hatásának meghatározására számos toxicitási teszt áll rendelkezésre, melyek közül célszerű a körülményeknek megfelelően választani. Az általam vizsgált kagyló mikronukleusz teszt alkalmazására számos szakirodalmi példa van, szabványosított formája azonban még egyelőre nem létezik. Annak érdekében, hogy a teszt általános alkalmazhatóságát felmérjem több különböző mérést végeztem, amelyek egyaránt kiterjednek a teszt egyes paramétereinek vizsgálatára, a mikronukleusz teszt eredményeinek összevetésére más genotoxicitás minősítő tesztekkel, valamint egyedi környezeti minták vizsgálatára.

Mivel a teszt szabványosítását nehezítheti, hogy nincs rá egységes módszer, az egyik vizsgált paraméternek az expozíciós időt választottam, amely bizonyítottan hatással van a keletkező mikronukleuszok számára. Szintén befolyásoló tényező lehet a kagylók mérete, azaz, a reakciók testméret függésének vizsgálata és leírása, amely a különböző tanulmányok összehasonlításánál fontos. Megállapítottam az expozíciós idő optimális hosszát, valamint azt a mérettartományt, amely még nem befolyásolja a mikronukleusz számot.

Szintén lényeges, hogy a kagyló mikronukleusz teszt milyen eredményt ad más, már szabványosított tesztekhez képest, és ismert hatású szennyezőanyagokra. Vizsgálataim során két baktérium teszttel, az SOS Chromotest-tel és az Ames teszttel, valamint egy viszonylag új módszerrel, a flow citometriás méréssel hasonlítottam össze a mikronukleusz teszt eredményeit. A kiértékelésnél mindenképpen figyelembe kell venni, hogy az egyes tesztek különböző hatásmechanizmusokra épülnek, így ugyanarra az anyagra eltérő erősségű válaszokat kaphatunk.

A változatos környezeti minták konkrét toxicitás vizsgálata jelentős részét képezte feladataimnak. A különböző jellegű minták a környezetben előforduló genotoxikus anyagok több csoportját is lefedték, így adott volt a lehetőség, hogy minél teljesebb képet kapjak a mikronukleusz teszt alkalmazhatóságáról. Vizsgáltam allelopatikus növényi kivonatokat, amelyek természetes eredetű szennyezők; különböző szennyvíz mintákat, amelyek igen vegyes összetételűek; biodízel mintát, amelynek a vizsgálata a környezettudományban több szempontból is aktuális; valamint természetes, de feltehetőleg szennyezett élőhelyek *in situ* felmérését is elvégeztem. Az eredményeim alapján a mikronukleusz tesztet széles körben alkalmazható, a változatos körülményekhez adaptálható eljárásként ajánlom a genotoxikus hatás felmérésére.

Abstract

Several toxicity tests are available to determine the effects of genotoxic compounds in the environment, from which it is practical to choose one which fits the conditions. There are many specialized literature examples for the mussel Micronucleus test I have chosen but there isn't a standardized form yet. To be able to estimate the applications of the test I have done several different measurements which also covered the analysis of the parameters of the test, the comparison of the results of the Micronucleus test with other genotoxicity tests as well as I have examined unique environmental pollutants.

Because the standardisation of the test is aggravated by the missing of a unified method I have chosen for one of my examined parameter the exposure time, what has been proved to affect the number of the forming micronucleuses. The size of the mussels can be an influential factor as well what can be important by the comparing of the different studies so I have analysed the effects of this, too. I have determined the optimal length of the exposure time and the range of the size which does not influence the number of the micronucleus.

It is important as well to analyse the results of the MN test compared to other standardized and offered test by known pollutants. During my examinations I have compared the MN test results with two bacteria tests with the SOS Chromotest and with the Ames test as well as with a relative new method the Flow cytometric measurement. During the evaluation it needs to be considered that each test sings different effect mechanisms so they can give different results for the same pollutant.

The concretized toxicity examination of the diversified environmental samples was giving the significant part of my work. The different kind of the samples has covered more groups of contaminating materials, found in the environment so the chance was given for me to get a more complex view of the potential of the application of the MN test. I have examined allelopathy samples of plants which are natural contaminators, different waste water samples which had a very mixed composition, biodiesel samples which research is in the environmental science in many aspects relevant and I have investigated *in situ* natural but presumably contaminated habitat. Due to my results the micronucleus test is a method that can be used in a wide range and can be adapted to the diverse conditions to estimate genotoxic effects.

Auszug

Damit die Effekte der in der Natur auffindbaren genotoxischen Substanzen definiert werden können stehen viele toxische Tests zur Verfügung, von denen es zweckhaft ist anhand der Umstände zu wählen. Für die Anwendbarkeit des Muschel Mikronukleus Testes stehen viele fachliterarische Beispiele zur Verfügung, aber eine standardisierte Form gibt es bis jetzt noch nicht. Um die Anwendbarkeit des Testes studieren zu können habe ich viele verschiedene Messungen gemacht, die sowohl die verschiedenen Parameter des Tests untersuchen, die Ergebnisse der Mikronukleus Probe mit anderen Tests die die Genotoxizität messen als auch eigene umweltliche Patterns forschen.

Weil die Standardisierung des Tests davon erschwert wird, dass noch keine einheitliche Methode vorhanden ist, habe ich für eins der untersuchten Parameter die Exposition Zeit gewählt, die bezeugt einen Effekt auf die generierte Nummer des Mikronukleus hat. Die Größe der Muscheln kann auch eine beeinflussende Ursache sein, das bei dem Vergleich der verschiedenen Forschungen von Belang sein kann, deshalb habe ich auch diesen Effekt untersucht. Ich habe die optimale Dauer der Expositionszeit beurteilt sowohl den Größenbereich das die Anzahl der Mikronukleusse noch nicht beeinträchtigt.

Es ist auch von Belang was für ein Ergebnis erfolgt im Vergleich zu dem schon bekannten und vorgeschlagenen Test für die schon bekannten genotoxischen Substanzen. Während meiner Forschung habe ich die Ergebnisse der Mikronukleus Proben mit zwei Bakterien Test, mit dem SOS Chromotest und mit dem Ames Test als auch mit ein relativ neues Verfahren mit dem Flow cito metrischen Messung verglichen. Bei der Auswertung muss man unbedingt in Acht nehmen, dass die einzelnen Tests verschiedene Wirkungsmechanismen zeigen so können sie für die gleiche Substanz unterschiedliche Ergebnisse vorbringen.

Die Untersuchung der konkreten toxikologischen Effekten von den vielfältigen natürlichen Vorlagen hat einen beachtlichen Teil meiner Arbeit ausgemacht. Die verschiedenen Arten der Proben haben mehrere Gruppen der in der Natur vorfindbaren genotoxischen Ich habe allelopathiesche Pflanzenextrakte untersucht die Kontaminationsmittel natürlichen Ursprungs sind; verschiedene Abwasservorlagen, die sehr gemischte Zustände hatten, Biodiesel Vorlagen, dessen Untersuchung in der Umweltwissenschaft wegen mehreren Hinsichten aktuell ist als habe ich auch die *in situ* Messung von natürlichen aber wahrscheinlich kontaminierten Lebensräumen ausgeführt. Anhand meiner Ergebnisse ist die Mikronukleus Probe ein, im weiten Umgang anwendbar, zu den diversen Verhältnissen adaptierbares Verfahren um die genotoxischen Wirkungen zu ermessen.

Bevezetés

A környezetszennyezés az emberi társadalmak szerencsétlen velejárója, amely nem csak az embert és az élőlények sokaságát, hanem az ökoszisztémák működését is veszélyezteti. A szennyezés egyaránt kihat az egyes környezeti elemekre, mint a levegő, a víz vagy a talaj, míg természetét tekintve lehet valamilyen anyag (pl. nehézfém, szerves oldószer, peszticid stb.), sugárzás, vagy az emberi tevékenység egyéb velejárója, például a zaj és a fény. Az egyes szennyezések különböző módokon fejtik ki hatásukat, melyek közül bár már hosszú ideje ismertek a mutagén és genotoxikus hatások, ezek pontos leírását, okainak és mechanizmusainak vizsgálatát a technológia hiányossága sokáig korlátozta. Az elmúlt 10-20 év fejlődése számos kérdést megválaszolt és legalább ugyanannyi új kérdést is hozott. Az biztos, hogy ezek a hatások komoly aggodalomra adnak okot, mivel számos súlyos betegség kiváltói lehetnek, ráadásul a génállományt és génszerkezetet érintő változások az utódokra is kihathatnak.

Az elmúlt évtizedben globális szinten is egyre sürgetőbbé vált a környezetvédelem és ennek érdekében az alkalmazott technológiák és anyagok tisztaságának elősegítése, a környezetbe jutó köztes- és végtermékek, majd lebomlási termékek hatásának kutatása az ökoszisztémákra, és figyelembevételük az új technológiák bevezetésében.

Ahhoz, hogy közbe tudjunk avatkozni, ha a környezetünk romlásnak indul, fontos, hogy mindig ismerjük annak referencia (eredeti, kiindulási), valamint az aktuális állapotát, és folyamatosan nyomonkövessük a változásokat. Ezt a fizikai és kémiai paraméterek monitorozásával, a környezeti elemek megfigyelésével valamint a flóra és fauna összetételében végbemenő változások követésével tehetjük, természetesen a befolyásoló hatások minél pontosabb ismerete mellett (pl. WFD 2000). A környezetállapot felmérés egyik eszköze lehet az *in situ* jelleggel alkalmazott mikronukleusz teszt (MN teszt) is, amennyiben pontosabb képet kapunk az alkalmazhatóságáról.

A kagyló mikronukleusz teszt egy viszonylag egyszerű és költséghatékony teszt, Magyarországon azonban kevésbé elterjedt. A 4 napos expozíciós idő miatt a baktérium teszteknel lassabban ad eredményt, azonban nagy előnye, hogy mivel a kagylók (az emberhez hasonlóan) képesek bontani bizonyos szennyezőanyagokat, ezzel a teszttel a képződő metabolitok toxikusságát is mérhetjük. A teszt elterjedését elősegítendő, különböző anyagokkal és különböző körülmények között vizsgáltam az alkalmazhatóságát, valamint összevettem az érzékenységet bakteriális genotoxicitás tesztekkel. A vizsgálatok megtervezésénél figyelembe vettem a környezetvédelem aktuális problémáit és kevésbé ismert területeit is.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Tesztszervezetek bemutatása

Az édesvízi biodiverzitás indikátorai – fajsám, populációk sűrűsége, megújulási ideje – az elmúlt évtizedek során egyre nagyobb mértékű csökkenést mutatnak. Az édesvízi állatok fajgazdagságát jelzi, hogy bár a bolygó felszínének alig 1%-át borítja édesvíz, mégis itt él az összes állatfaj 7%-a (Dudgeon, 2010). A hozzávetőleg 840 édesvízi kagylófaj közül 2003-ban még alig száz volt legalább mérsékelten veszélyeztetett, míg 2013-ra ez a szám megkétszereződött elsősorban az *Unionidae* családba tartozó fajok növekvő veszélyeztetettsége miatt (Graf & Cummings, 2007; IUCN 2003; IUCN 2013). A kagylók (*Bivalvia*, jelentése: kétteknőjűek) a puhatestűek törzsébe tartoznak. Rendszerezésük a kopoltyú, valamint a fogak alapján történik, mely szerint az általam vizsgált folyami kagylók (*Unionoida*) a *Paleoheterodonta* alosztály egyedüli élő rendje. Nagy számban ismertek mind édesvízi és tengeri fajok (ITIS).

A kagylók ismertek víztisztító szerepükről, ami nem csak a toxikológiai tesztekben használható fel, de ökológiai hasznuk is jelentős az élővizekben. Az általuk megszűrt vízből kiválasztott lebegőanyagok egy részét megemésztik és beépítik saját testükbe, héjukba, míg a meg nem emésztett részt nyálkába burkolva engedik vissza a vízbe (pszeudofécesz). Az ilyen módon kiválasztott és kompaktabb pszeudofécesz pelletbe tömörített lebegőanyagok az üledéket vastagítják. A kagylók ezen szűrő-ülepítő szerepe tehát geológiai jelentőségű (Haranghy, 1959).

A kagylók héját a táplálékukból kivont kalciumból állítja elő a köpeny, melynek ezen kívül az oxigénfelvételben és az áramlatkeltésben is fontos szerepe van (Brown, 1971). A köpenyen található a táplálkozáshoz elengedhetetlen bevezető (ventrális) és a kivezető (dorzális) szifó nyílása. A bevezető szifón szívják be a táplálék dús vizet és vezetik tovább a kopoltyúüregbe, ahol a kopoltyúlemezeket borító csillók kiszűrik a táplálékul szolgáló planktont és detritusz részecskéket. A megszűrt víz, a salakanyagok és a parazita lárvák az elvezető szifón távoznak a kagylóból (Jørgensen, 1991).

A puhatestűek nyílt keringési rendszerét alkotó testnedv (hemolimfa) igen híg, és bár kevés alakos elemet tartalmaz, az itt található hemociták felelősek a szervezet ellenálló képességének fenntartásához, illetve az immunrendszer megfelelő működéséhez nélkülözhetetlen öröklött sejtes immunválaszért. Figyelembe véve, hogy a gazda szervezet elsődleges védelmi vonalát a hemociták képezik, és megfelelő működésük nélkülözhetetlen a hatásos immunválaszhoz,

megállapítható, hogy a sérült sejtek számával jól jellemezhető az állatok egészségi állapota (Terehara et al., 2003).

1.2. A kagylók, mint tesztalanyok

A kagylók több szempontból is jó tesztalanyok a vizek szennyezettségének meghatározására végzett toxikológiai tesztekhez. Táplálkozásuk során rövid idő alatt is nagy mennyiségű vizet szűrnék át (*Unionidae* fajok 15 °C vízhőmérsékleten kb. 6-8 l/nap /Kim et al., 2011/), így könnyen kumulálódnak bennük a különféle szennyező anyagok. Kagylók és kagylólárvák használata vizek toxikusságának meghatározását célzó tesztekben már évtizedek óta elterjedt (Bedford et al., 1968; Landres et al., 1988). Vízi környezetben a kagylók érzékenysége kiemelkedő, sokféle szennyezés kimutatására alkalmazhatóak, a toxikus közegben adott reakcióik miatt széleskörűen alkalmazott bioindikátorok (Imlay, 1982, Jurkiewicz-Karnkowska, 1998).

Általánosságban elmondható, hogy a kisebb méretű kagylók rövidebb élettartamúak, míg a nagyobb méretűek tovább élnek. A kagylók korát legegyszerűbben a héj körgyűrűinek számából lehet meghatározni, bár ez több mindentől is függ, az eredmény jó közelítéssel pontos. Mivel a kagylók életük során folyamatosan nőnek, a hosszuk és koruk között is szoros összefüggés van, azonban különböző területeken a növekedés mértéke illetve a maximális életkor eltérő lehet, így ezek nem összehasonlíthatóak. Ennek tudható be, hogy az *Unionoida* fajok átlagos élettartamáról eltérőek az irodalmi adatok. Az *Anodonta* és *Unio* fajoknak általában 10-15 évet jósol Brander (1956) és Smith (2001), míg más források szerint 20-30 évet is élhetnek (pl. Comfort, 1957). A kor előrehaladtával a reprodukciós siker is növekszik, egyrészt mivel az idősebb egyedek gyakrabban szaporodnak, másrészt a nagyobb mérethez nagyobb kopoltyú tartozik, amiben több glochidium fejlődik ki (Aldridge, 1999; Bauer, 1992).

1.3. Kagylótesztekben alkalmazott fajok

Az édesvízi kagylók legelterjedtebben alkalmazott tesztorganizmusai két nagy rendbe tartoznak, ezek a *Veneroida* és *Unionoida* fajok.

1.3.1. *Unionoida*

A festő kagyló (*Unio pictorum*, Linnaeus, 1758) (1. ábra) őshonos kagylófaj a Balatonban, de szinte egész Európában és kis Ázsiában több területén is megtalálható, bár nem gyakori.

Köznapi nevét onnan kapta, hogy régen a festőművészek a kagylók héjában keverték ki festékeiket. A kifejlett kagylók átlagosan 7-10 cm hosszúra nőnek, bár az idősebb egyedek a 14 cm-t is elérhetik. Az egyedek növekedésének sebessége, így az átlagos és a maximális hosszuk élőhelyenként eltérő lehet az egyedi körülmények miatt. Héjuk színe a fakó sárgától a barnáig terjed, helyenként zöldes árnyalatot vehet fel. A hasonló külsejű folyami kagylótól (*Unio tumidus*) a héj alakja alapján lehet megkülönböztetni, ugyanis az *U. pictorum* héjának alsó szegélye egészen egyenes – az alsó és felső szegély közel párhuzamos – nem pedig domború (Nagel, 2015).



1. ábra: A festő kagyló (*Unio pictorum*)

Egyaránt megtalálható tavakban, lassú folyású folyókban, holtágakban és csatornáknban, ahol az általa kedvelt homokos vagy iszapos aljzat dominál. Elterjedésében szerepet játszhat, hogy a magasabb víz hőmérsékletet is elviseli, így más őshonos fajoknál kevésbé korlátozzák a forró nyarak. Átlagos életkora 15 év körül van, de tápanyag szegény vizekben hosszabb, akár 20 évig is élhet. A szaporodási csúcs április és július közé tehető, de egy szezon alatt többször is kibocsáthat glochidiumokat. Ezek száma a kagyló méretétől függ, de akár 200 ezer glochidiumot is kibocsáthat egyszerre, amelyek a környezetükben őshonos halfajokon tapadnak meg és 1-2 hétig maradnak rajtuk. Ilyen nálunk a compó (*Tinca tinca*, Linnaeus, 1758), a sügér (*Perca fluviatilis*, Linnaeus, 1758), a fenékjáró küllő (*Gobio gobio*, Linnaeus, 1758), a tüskés pikó (*Gasterosteus aculeatus*, Linnaeus, 1758), a bodorka (*Rutilus rutilus*, Linnaeus, 1758), a veresszárnyú keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*, Linnaeus, 1758) vagy a fejes domolykó hal (*Squalius cephalus*, Linnaeus, 1758). Az idősebb kagylókban esetenként előfordulhat gyöngy, de nem jellemző (Nagel, 2015).

A hosszú életük és szesszilis életmódjuk miatt az *Unionoida* fajok kifejezetten alkalmasak az alacsony vagy szakaszos expozíciójú szennyezések vizsgálatánál (Farris & Van Hassel, 2006).

Azokon a területeken, amelyeken az *U. pictorum* őshonos, jó választás lehet *in situ* vizsgálatokhoz. A genotoxikus anyagokkal való szennyezettség mértékét a Comet teszt és a mikronukleusz teszt segítségével lehet meghatározni, míg a nehézfémek és PAH-ok jelenlétét az egyes szennyezőkre specifikus biomarkerek vizsgálatával lehet kimutatni. A bioakkumulációs adatok csak akkor tükrözik a tényleges koncentrációk mértékét, ha ezek biológiailag hozzáférhető hányada kellően magas (Guidi et al., 2010).

Az amuri kagyló (*Sinanodonta woodiana*, LEA, 1834) (2. ábra) Délkelet-Ázsiában, illetve Oroszország keleti részén, az Amur vidékén őshonos, magyar nevét is innen kapta (Graf, 2007). Nagyméretű faj, elérheti a 30 cm-es testhosszt, illetve 1 kg tömeget. A héj alakja az Anodontinae alcsaládban lévő európai fajokkal ellentétben viszonylag rövid és elliptikus, a középső részen majdnem kerek és az *Anodonta* fajokhoz képest nagyon vastag. Színe a sötétbarna és sárgászöld különböző árnyalatait veszi fel, helyenként vöröses csíkokkal (Von Proschwitz, 2008).



2. ábra: Az amuri kagyló (*Sinanodonta woodiana*)

Nemcsak mérete szempontjából robusztus: viszonylag jól tűri a környezetszennyezést, őshazájában eutróf, sőt hipereutróf tavakban is előfordul (pl. Liu et al., 2010). Nemcsak elviseli, hanem kifejezetten kedveli a magas (30°C körüli) vízhőmérsékletet, így alacsony oldottoxigén-koncentráció mellett előnyben van a többi kagylófajjal szemben. A fiatal egyedek intenzívebb szűrőképessége alkalmassá teszi őket természetvédelmi felhasználásra is (Kim et al., 2011). Eredeti elterjedési területének egyes országaiban gyöngytermesztésre használják, de

biomanipulációs vízminőségjavításra is alkalmas. Kínában fogyasztják is, ami némi kockázattal járhat, mivel a kínai tavak jelentős része szennyezett, a *S. woodiana* pedig jól akkumulálja a különböző szennyező komponenseket, így a testébe bekerült mérgek a kagylót fogyasztó emberek szervezetébe is bekerülhetnek (Jiao et al., 2014). Bioakkumulációs képessége révén ugyanakkor jó indikátor szervezet is (Królak & Zdanowski, 2001).

Az *Unionidae* családba tartozó kagylók jellegzetessége, hogy ektoparazita lárvái (glochidium) halakon tapadnak meg és bizonyos fejlődési szint eléréséig azokon élőködnek. A szaporodási csúcs június-augusztusban történik, majd a kibocsátott glochidiumok átlagosan 7-10 napot töltenek a gazdaszervezeten. A parazita szakasz hosszát nagyban befolyásolja a vízhőmérséklet, 25°C körüli vízben rövidebb ideig, 15°C-ban akár 15-18 napig is eltarthat (Dudgeon & Morton, 1984). A *S. woodiana* morfológiája nagyban hasonlít az őshonos tavi kagylóéhoz (*Anodonta anatina*, Linnaeus, 1758). A 14-15 éves egyedek akár a 20 cm-es hosszt is elérhetik, bár ez élőhelyenként eltérő lehet. A kifejlett egyedek a Balatonban valamivel kisebbek, mint Magyarország más területein, átlagosan 15-17 cm hosszúra nőnek meg. A héj színe a sötét sárga és a sötétbarna árnyalatait veszi fel, esetenként vöröses csíkokkal. A hasonló külsejű tavi kagylótól a jellegzetesen kiemelkedő búb alapján lehet megkülönböztetni (Benkő-Kiss et al., 2012).

A *S. woodiana* inváziója viszonylag új probléma, világméretű terjedésének kezdete a 20. század második felére tehető (Douda et al., 2012). A *S. woodiana* sikeres inváziójának elsődleges oka a hatásos szaporodási módja. A parazita életmódú glochidium lárvái megtapadnak a halak úszóján, így viszonylag nagy távolságokra is eljutnak. Európába feltehetőleg mesterséges úton, a távol-keleti szűrő életmódú és „növényevő” halak (pettyes busa, *Hypophthalmichthys nobilis*, Richardson, 1845; fehér busa, *Hypophthalmichthys molitrix*, Valenciennes, 1844; amur, *Ctenopharyngodon idella*, Valenciennes, 1844) állományaival került be. Figyelembe véve, hogy köztes gazdajaként az európai vizekben őshonos halak is megfelelnek, nagyobb a terjedés valószínűsége, mint a többi kagylófajnál (Báskay et al., 1996).

A *S. woodiana* gyakorlatilag szinte valamennyi európai országban megtelepedett, egyelőre kivételt képeznek a Brit-szigetek, illetve Európa északabbi területei. Magyarországon valószínűleg már az 1960-as években megjelent, de leírására csak 1984-ben került sor, egy gyulai csónakázó tóból (Petró, 1984). Mára Európa nagy részén elterjedt ez a gyorsan szaporodó, nagytestű, invazív kagylófaj. Magyarországon legnagyobb tömegben a Körös egyes holtágaiban található meg (Kiss, 1990). A Balatonban 2006-ban regisztrálták a faj első megjelenését, a Keszthelyi-öbölben akkor már 4-6 éves példányokat találtak, így a bejutása feltehetőleg 2000 környékére tehető (Majoros, 2006). A kagyló a nyugati (Keszthelyi)

medencében 2011-re dominánssá vált, de a tó keleti része ekkor még *S. woodiana* mentes volt. Ez azért is fontos, mert több szakmai fórumon is szerepelt az a feltételezés, hogy a Balatonba a Sió-csatornán keresztül kerülhetett be (Benkő-Kiss et al., 2013).

Az 1994-1996 között végzett részletes elemzés alapján bár magában a csatornában előfordult a kagyló, bejutását a Balatonba valószínűleg meggátolta a Sió-csatorna környékén jellemző üledékszerkezet. A déli part laza sekély és mobil homokpadja kevésbé alkalmas az *Unionidae*-k megtelepedésének, mert a juvenilis kagylókat a homok mozgása könnyen betemeti (Kiss, 1997).

Másik lehetséges inváziós centrum a Balaton déli vízgyűjtőjén található halas-, és horgásztavak. Ezen tavak egy részébe már korábban bekerülhettek a vízgyűjtőn kívülről származó, glochidiumokkal fertőzött halak. Egy 2013-ban végzett vizsgálat a déli part fő befolyóin, és a rajtuk létrehozott halas-, és horgásztavakon vett szisztematikusan mintákat az ott található kagylófajokból. Több befolyón illetve halastóban a *S. woodiana* volt a domináns faj, bár többnyire őshonos fajokkal együtt volt megtalálható. Mivel a feltételezett bekerülése óta már túl sok idő telt el, így nyilvánvaló, hogy ezek az adatok nem mutatják egyértelműen, pontosan melyik halastóból, melyik befolyóból kerülhetett annak idején a tóba a faj, de tény, hogy a Keszthelyi-medencében vált dominánssá, így valószínűleg a fertőzési centrum is a tó nyugati részén lehetett. A 2011-es balatoni adatsort összevetve egy 1992-es felmérés eredményeivel, látható, hogy a Keszthelyi-öbölben a *S. woodiana* teljesen kiszorította a kacsakagylót (*Anodonta cygnea*), és a tavi kagyló (*Anodonta anatina*) részaránya is 17,8%-ról 8,6%-ra csökkent (Kováts et al., 2014).

Egyelőre nem lehet pontosan tudni, miért sikeresebb a faj a többinél. Egyik lehetséges magyarázat a *S. woodiana* gyors növekedése, amivel gyakorlatilag fizikailag is kiszoríthatja a versenytársakat. Ez a fizikai kiszorítás már lárvakorban is megfigyelhető: a halgazdán elfoglalt helyért nemcsak fizikai értelemben folyik versengés, hanem a *S. woodiana* glochidiumok adaptív immunválaszt válthatnak ki, ami a többi lárva megtapadását akadályozza (Rogers & Dimock, 2003). Bár viszonylag kevés összehasonlító tanulmány született annak az értékelésére, hogy a *S. woodiana* mennyivel tűri jobban a szennyezett környezetet, mint őshonos kagylófajaink, néhány szerző eredményei alapján valószínűsíthető, hogy valóban nagyobb az ellenállóképesse (pl. Ponta et al., 2002). Ez nyilván előnyösebb versenyhelyzetet teremt számára a többivel szemben. Világszerte érzékelhető tendencia az őshonos *Unionidae* fajok állományának csökkenése, amelynek részben az élőhelyek szennyezettsége az oka (Lydeard et al., 2004).

Azokon a területeken, ahol a *S. woodiana* nagy mennyiségben található, jelentős szerepet tölthet be több makrogerinctelen faj (legnagyobb mennyiségben vándorkagyló) megtelepedésében, amelyek számára „élő aljzatként” szolgálhat. A *S. woodiana*, amely az iszapos aljzatot kedveli, így hozzájárul a vándorkagyló terjedéséhez, amely általában a köves parti zónában található meg, de ilyen módon az iszapos területeken is képes nagyobb telepeket létrehozni (Balogh et al., 2014).

A hazánkban idegenhonos, kifejezetten invazív *S. woodiana* több szempontból is ideális tesztszervezet toxikológiai tesztekhez. Jelentős elterjedési területén elég gyakori és viszonylag könnyen gyűjthető. Mint a kagylók általában, a *S. woodiana* is fontos funkcionális elemét reprezentálja az ökoszisztémának, de idegenhonos, invazív mivolta miatt gyűjtése és vizsgálata nem von maga után etikai problémákat. Számos kísérletet végeztek környezeti monitoringban és szennyező források kimutatására való felhasználhatóságáról.

Woznicki et al. (2004) egy ismert genotoxikus szennyező, a benzapirén segítségével vizsgálták és bizonyították be a *S. woodiana* alkalmazhatóságát víztoxikológiai tesztek és környezeti minták vizsgálata során. A már említett JDS tanulmányban szintén a Comet teszt segítségével értékelték a Duna környezeti állapotát terepen gyűjtött *S. woodiana* és *Unio sp.* egyedek alapján. A vizsgálatban a két teszt eredménye korrelált egymással, ami megerősítette az adatok hitelességét. Az idegenhonos és az őshonos fajok érzékenysége között nem tapasztaltak szignifikáns eltérést, mindkettő sikeresen jelezte a különböző szennyező források (pl. kommunális szennyvíz kibocsátás, mezőgazdaság, olajfinomító) okozta környezetterhelés hatását (Kolarevits et al. 2016). Konkrét szennyezők tekintetében egy 2001-es tanulmány összehasonlítva vizsgálta a *S. woodiana* és az őshonos *A. anatina* érzékenységét nehézfémek akkumulációjára. Az eredmények alapján a *S. woodiana* olyan mértékben akkumulálta a nehézfémeket, hogy bioremediációs célokra is alkalmas lehet (Królak & Zdanowski, 2001). A nehézfémek mellett peszticidekre mutat még különös érzékenységet, amelyeknek jó mérőszáma lehet mind magas, mind rendkívül alacsony koncentráció esetén. Kínai kutatók hexaklorociklohexán (HCH) és diklór-difenil-triklóretán (DDT) maradványokat mutattak ki *S. woodiana* egyedekben olyan területen, ahol az említett szereket már több 20 éve betiltották (Bian et al., 2009). Egy olasz kísérletben természetes környezetben (egy folyó mellett mesterségesen kiépített csatornaszakaszon) vizsgálták peszticidek akkumulációját *S. woodiana* és *Corbicula leana* egyedeken. Az eredmények azt mutatták, hogy bár a *C. leana* magasabb mennyiségben akkumulálta a vizsgált szennyezőket, a maximális peszticid koncentráció után 5-7 nappal a *S. woodiana* egyedek magas mortalitását tapasztalták (Uno et al., 2001).

Vizsgálataim során a kagyló MN teszthez *U. pictorum* és *S. woodiana* egyedeket használtam. Tesztalanyként való alkalmazásra a *S. woodiana* lenne előnyösebb, mivel invazív fajként a gyűjtése és használata nincs korlátozva, valamint széles körben elterjedt, könnyen gyűjthető nagy mennyiségben. Ugyanakkor invazív jellegét a hatásos szaporodása mellett éppen a szennyezőkre mutatott nagyobb ellenállóképessége okozhatja. Az őshonos *U. pictorum* ezzel szemben bizonyítottan érzékeny több környezeti szennyezőre, de mivel a halászati törvény (2013. évi CII. törvény a halgazdálkodásról és a hal védelméről) az őshonos halak és kagylók védelmére külön hangsúlyt fektet, így gyűjtésük és használatuk engedélyhez kötött.

Az *Unionoida* fajok közül gyakran alkalmazzák nem megfelelően kezelt szennyvizek minősítésére az *Elliptio complanata* egyedeket. *In vitro* módszerrel tesztelt antibiotikumok környezetileg releváns mennyiségben külön-külön és együttesen is növelték a vizsgált egyedek immunválaszát (Gust et al., 2012). Egy hosszú távú (28 és 180 napos expozíció) teszt során a szintetikus ösztrogén hatását vizsgálták egyes biomarkerekre és a reprodukcióra szintén *E. complanata* egyedeken. Az eredmények alapján már az 5 ngL⁻¹-es koncentráció kimutathatóan növelte a biomarkerként használható vitellogenin fehérje szintjét, valamint eltéréseket okozott a kibocsátott glochidiumok és tojások arányában. A teszt arra is rámutatott, hogy a krónikus tesztek alkalmazása az akut tesztek mellett összetettebb képet adhat a toxikus hatás jellegéről (Leonard et al., 2017).

Falfushinska és et al.. egy összetett vizsgálatot végeztek a Dnyeszter folyóból (Ukrajna) gyűjtött *Unio tumidus* egyedeken. A két gyűjtési pont egyike egy szennyezésmentes terület volt, amelyet referenciának is használtak, a többi kagyló egy kezeletlen szennyvízzel terhelt szakaszból származott. A kagylókat 7 napig akklimatizálták laboratóriumi körülmények között majd a referencia területéről származó kagylókat csoportonként ibuprofén, triklozán és ösztron kezelésnek tették ki két hét expozícióval, valamint egy kontroll csoportot is elkülönítettek. A kezelés során kétnaponta megújították a szennyezők koncentrációját, hogy folyamatos terhelést szimuláljanak. Az expozíció végén számos biomarkert vizsgáltak, valamint a DNS károsodás mértékét. Az eredmények alapján a referencia csoport és a szennyezett területéről gyűjtött kagylók között még a teljes 3 hét laboratóriumban eltöltött idő után is szignifikáns eltérés volt az oxidatív stressz, a membrán integritás, a DNS károsodás és a vitellogenin szerű fehérjék tekintetében. Azt is kiemelték, hogy nem csak a tesztalany körütekintő megválasztása a fontos, hanem annak származása is (Falfushinska et al., 2014).

1.3.2. *Veneroida*

A *Veneroida* rendből leggyakrabban az ázsiai kagyló (*Corbicula fluminea*), a vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) és a kvaggakagyló (*Dreissena bugensis*) fajokat szokták ökotoxikológiai tesztekhez használni, közülük is leginkább akkumulációs vizsgálatokhoz.

Egy 2018-as tanulmányban a Kanada és USA határán elterülő Szent Lőrinc folyó biomonitorozását végezték el vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) és kvaggakagyló (*Dreissena bugensis*) egyedeket vizsgálva. Az immunmarkereket és különböző PAH, PCB és PBDE vegyületek bioakkumulációját mérő tesztekkel nem csupán az *in situ* biomonitoring lehetőségeit mutatták be, de az invazív *D. polymorpha* és az őshonos *D. bugensis* érzékenységét is összehasonlították, miszerint az invazív faj kisebb érzékenysége a vizsgált szennyezésre hozzájárulhat sikeres terjeszkedéséhez. Eredményeikben kiemelték, hogy a morfológiai alapú fajmeghatározás a két vizsgált faj esetében akár 25%-ban is téves lehet, ami eltérő akkumulációs jellemzőik miatt jelentősen befolyásolhatja a kapott adatok kiértékelését. (Evarist et al., 2018). Egy másik tanulmány során Olaszország nagy tavaiban élő *D. polymorpha* egyedekben vizsgálták POP vegyületek (perzisztens szerves szennyezők) akkumulációját. Az eredmények alapján a faj elég érzékeny volt ahhoz, hogy az egyik tóban egy 7 évvel azelőtti szennyezés következtében az átlagosnál 5-9-szer magasabb DDT koncentrációt mérjenek a vizsgált egyedekben (Riva et al., 2008).

Bár a *D. polymorpha* egy kisméretű kagylófaj, nagy mennyisége miatt jelentős szerepet játszik az élővizek természetes tisztításában. A Balatonban megtelepedett kagylóállomány akár a teljes víztérfogat 0,1%-át (kb. 1,7 millió m³) is képes megtisztítani az algától egyetlen nap alatt, így nagymértékben hozzájárul a vízminőség javulásához (Balogh et al., 2008).

Guo és et al.. (2018) közel negyven év publikációjának összegzésében mutatja be a *Corbicula fluminea* faj toxikus anyagokra adott válaszait. Egyaránt kitérnek a víz és az üledék vizsgálatára ammónia, fém vegyületek és szerves szennyezők esetében. A mért végpontok között szerepel a bioakkumuláció, az egyedek morfológiai és viselkedésbeli változásai valamint a biokémiai indexek. Az eredmények bemutatása után megtárgyalja a konkrét vízi szennyezés értékelésére, a toxikológiai mechanizmusok meghatározására, a toxicitás előrejelzésére és a bioremediációra vonatkozó kérdéseket is.

1.4. A kagylótesztek végpontjai

1.4.1. Mortalitás

A mortalitás végpontot alkalmazó tesztek elsősorban kagylólárvákkal dolgoznak. Az Egyesült Államokban létezik erre vonatkozó szabvány is, amely édesvízi kagylófajok glochidium lárváinak, ill. juvenilis egyedek alkalmazását szabályozza toxicitás-vizsgálatok céljára (ASTM /E2455-05/).

Awadhesh N. Jha és et al. (2000) kagylólárvákon teszteltek környezeti mintákat, és a kapott toxicitás adatokat a mintákban mért metil-metán-szulfonát és banzapirén koncentrációjával vetették össze. Tapasztalataik szerint komplex szennyezetté váló környezeti minták esetében egy megfelelően validált *in vivo* rendszer ugyanolyan érzékeny lehet, mint az analitikai vizsgálatok). Szintén környezeti minták vizsgálata segítségével mutatták ki, hogy a juvenilis *Corbicula fluminea* egyedek mortalitás adatai megfelelő mérőszámok lehetnek folyók deltatorkolatai általános szennyezetté válásának. Sőt, üledékminták vizsgálata során már egy nap után jelentős mortalitást tapasztaltak (amelynek mértéke arányos volt a 6 nap után mért teljes mortalitással), míg a vízminták esetén 2-3 nap után jelentkezett a mortalitási csúcs. Az eltérést valószínűleg a szennyezőanyagok két fázis közötti megoszlása okozhatta, így bár már egy nap után értékelhető eredményt kaphatunk, célszerű a vizsgálat idejét hosszabbra választani (Cataldo et al., 2001). Kováts és et al. (2010a) lapos tavikagyló (*Pseudanodonta complanata*) kajmacsos lárváival becsülte kommunális szennyvíz toxicitását. Megállapításuk szerint erre a típusú mintára a kagylólárvák érzékenyebbek, mint a szennyvizek minősítésére szabványosított Daphnia teszt. Egy másik tanulmányukban több kagylófaj (*Anodonta anatina*, *Unio tumidus*, *Pseudanodonta complanata*) glochidium lárváinak érzékenységét vetették össze réz-szulfátra, viszont nem tapasztaltak eltérést a fajok toxicitása között (Kováts et al., 2010b).

1.4.2. Növekedés

A növekedés egy viszonylag ritkán alkalmazott végpont, mivel a megfelelően mérhető adatokhoz az általános expozíciós időnél hosszabb távú tesztekre van szükség, így a több évig tartó folyamatos méréseknél lehet hasznos. Laboratóriumi vizsgálatok helyett az a végpont kifejezetten *in situ* teszteknel alkalmazható olyan fajokkal, amelyek a mérendő környezetben természetesen előfordulnak. Könnyen elvégezhető más végpontok mellett is, és mivel a növekedés sebességét nem egy, könnyen meghatározható faktor befolyásolja, hanem számos

környezeti és antropogén eredetű hatás összessége, így jó kiegészítő adat lehet a vizsgált környezet állapotának leírásában (Rogers et al., 2018).

Míg a felnőtt egyedek esetében csak egy több éves vizsgálat során lehet a szennyezés okozta növekedés csökkenést megfigyelni, addig a juvenilis kagylók már néhány hónap után szignifikáns eltérést mutathatnak egy kontroll környezethez képest. Ennek a módszernek az elterjedését hátráltatja, hogy a pár milliméteres kis kagylókat olyan ketrecbe kéne kihelyezni, amiből nem tudnak kijutni, de biztosítja a megfelelő áramlást és ellenáll a rongálódásnak (Barnhart, 2006).

1.4.3. Viselkedés és morfológia

A legelterjedtebben alkalmazott viselkedésbeli végpontja a kagyló teszteknek a filtráció. A kagylók védekezésképpen az egyes szennyezőanyagok jelenlétében csökkentik szűrésük sebességét, hogy minél kevesebb víz áramoljon át a köpenyüregen, s így kevesebb szennyezőanyag juthasson a szervezetükbe. Az ilyen anyagokat más végponttal is vizsgálva az eredmények sokszor nem mutatnak kellő összefüggést, ezért ajánlott a filtrációval együtt értékelni (Salánki & V.-Balogh, 1989). Mások azt is kimutatták, hogy a filtrációs aktivitás néhány óras késéssel reagál az adott stresszorra, amit figyelembe kell venni a teszt hosszának megválasztásánál (pl. Hartmann et al., 2016).

A viselkedéssel kapcsolatos végpontok közül általában egyszerre többet vizsgálnak és inkább minőségi, mint mennyiségi jelzést adnak, tehát adott szennyező(k) bizonyos koncentrációja fölött már szignifikáns eltérés tapasztalható, azonban a koncentráció emelkedésével nem feltétlenül arányos. Gyakorlatilag minden mérhető viselkedési forma lehet végpont; a filtráción kívül alkalmazzák még a héj nyitás/zárás, lábmozgást, oxigénfogyasztási és ammónia kiválasztási rátát, de van példa a légzés aktivitás vagy a beásási képesség mérésére is (Guo & Feng, 2018). A héj nyitás/zárás napi ritmusának alakulására ki lehet építeni olyan megfigyelő rendszert, ami akár valós idejű automata biomonitoring rendszerként is működhet, és korai figyelmeztetést adhat a potenciális ökotoxikológiai kockázatú területeken a szennyezés növekedéséről (Chen et al., 2012a).

A kagylók szervezetébe bekerülő szennyezőanyag hosszabb idejű kontaktus során egyes szervekben morfológiai elváltozást okozhat, ami kórszövettani elemzéssel kimutatható. A legelterjedtebben az emésztőmirigyből vett mintát vizsgálják, mivel a xenobiotikumok ártalmatlanításában fontos szerepe van, valamint a metabolizmus és az akkumuláció fő helye, így itt várható először elváltozás, de a kopolyú, vese és ivarmirigyek biopsziája is hasznos lehet. Az előre meghatározott vizsgálatok mellett célszerű feljegyzéseket készíteni az egyéb,

szokatlan elváltozásokról is, ami a szövettani elemzéssel együtt hozzájárulhat a vizsgált szennyezők hatásmechanikájának megismeréséhez is (Rogers et al., 2018; Guo & Feng, 2018).

1.4.4. Akkumuláció

Akkumulálódó vízszennyezők vizsgálatára, kimutatására a kagylók jobb tesztalanyok, mint a halak, mivel – szesszilis, szűrőgető életmódjukból adódóan – nagyobb mennyiségben veszik fel és raktározzák el ezeket a vegyületeket (Ponta et al., 2002). Królak és Zdanowski vizsgálatai pedig bebizonyították, hogy a kagylók teste tartalmazza az akkumulált nehézfémek jelentős hányadát, míg a héjba lényegesen kevesebb épül be (Królak és Zdanowski, 2001). Az akkumulálódó szennyezők vizsgálata során számos nehézséggel kell megküzdeni. Mint bármely más szennyező esetében, itt is jelentős eltérések vannak az egyes fajok érzékenysége – az akkumuláció mértéke – között, így a tesztalany megválasztása jelentősen befolyásolhatja az eredményeket. Az akkumulációra hatással vannak egyes abiotikus faktorok is, mint a víz tápanyag tartalma és pH-ja, de a kagylók mérete és táplálékuk minősége is fontos lehet. Figyelembe kell venni, hogy több szennyező esetén szinergikus, additív és antagonisták kölcsönhatások is felléphetnek, de ezekről még kevés információ áll rendelkezésre (Guo & Feng, 2018).

Az akkumulációs tesztek során célszerű egyidejűleg a filtrációt is vizsgálni, mivel előfordulhat, hogy a szennyező anyag ellen a kagylók úgy védekeznek, hogy lecsökkentik az aktív időszakukat (a napnak az az időszaka, amit kisebb megszakításokkal, de nagyjából egybefüggően filtrációval töltenek), így kevesebb vizet szűrnek át, tehát kevesebb szennyezőt fognak akkumulálni (Salánki & V.-Balogh, 1989). A víz nehézfém vagy PAH tartalma és ezek kagylókban akkumulált mennyisége között sok esetben nincs kimutatható kapcsolat, ami részben magyarázható az adott anyag biológiai hozzáférhetőségével (Guidi et al., 2010; Bonnail et al., 2016). Ugyanakkor a perzisztens szennyezők (pl. DDT, PCB-k) viszonylag zárt környezetben (pl. egy lefolyás nélküli tóban, felszín alatti vízben) évtizedek múltán is kimutatható hatással rendelkeznek (Riva et al., 2008).

Az akkumulációs vizsgálatok gyenge pontja, hogy gyakran a tesztalany elpusztításával jár, mivel a kis méretű kagylókat általában egyszerűen homogenizálják a méréshez, nagyobb méretű kagylók esetében pedig a szövetminta vétele okozhat végzetes sérülést. Mivel ezek a tesztek jelentős részét képezik az ökotoxikológiai vizsgálatoknak, ezek során a lehetőségekhez mérten ajánlott a nem letális biopszia eljárásokat alkalmazni (Naimo et al., 1998).

Egyes fajok magas filtrációs rátájuk és akkumulációs képességük miatt sikeresen alkalmazhatóak nehézfémekkel szennyezett vizek bioremediációjában vagy szennyvízzel terhelt folyószakasz tisztításában (Rosa et al., 2014; Pipolo et al., 2017).

1.4.5. Biokémiai és immunmarkerek

A technológia fejlődésével egyre kidolgozottabb módszerek jelennek meg az úgynevezett biomarkerek ökotoxikológiai hasznosítására, mivel bármilyen toxikus hatás előbb jelentkezik szubcelluláris szinten, mint annak szöveti és szervi manifesztálódása, vagy maga a mortalitás (Zuykov et al., 2013). Ezeket a biomarkereket nagy általánosságban két csoportba sorolhatjuk. A molekuláris szintű változásokat biokémiai markerekkel követhetjük, míg a valamivel összetettebb hatásokat, amelyek beindítják a szervezet védekező rendszerét immunmarkereknek nevezzük, bár a kettő között nem mindig éles a határ.

Az immunmarkerek alapját a szennyezőanyag hatására a szervezet védekező rendszerében bekövetkező változások adják. Kagylók esetében az első védelmi vonalat a hemolimfában lévő hemociták jelentik, amik fagocitózissal próbálják eliminálni a test belsejébe jutott mikroorganizmusokat és szennyezőanyagokat. Ezt követi a reaktív oxigéngyökök képződése (Reactive Oxygen Species: ROS) valamint lizozimek termelése, ami általános jelzés. A hemociták ezek mellett nitritet is termelnek, amiből egyrészt baktericid hatóanyagot állítanak elő, másrészt viszont immunmodulátorként is működik. A gyulladáshoz vezető reakciók indikátora az ilyen esetekben keletkező ciklooxigenáz (COX) lehet. Ezekre a folyamatokra épülnek az immunmarkerek, mint a hemociták mérete, mennyisége és életképessége (flow citometriás módszerrel mérhető), a fagocitózis mértéke, COX aktivitás a hemocitákban, lizoszóma aktivitás, nitrit koncentráció a hemolimfában, illetve az oxidatív aktivitás (ROS), ami az ártalmatlanító kapacitás egyik leggyakrabban mért indexe (Gust et al., 2012). Az immunmarkerek alkalmazásának nagy előnye, hogy *in vitro* módon is elvégezhetőek hemolimfa mintából, és mivel a kagylókban egyébként is közvetlenül érintkezik a víz a szövetekkel, az eredmény a valós folyamatot fogja leírni (Evarist et al., 2018).

Biokémiai marker általában a detoxifikációs rendszer részét képező különböző fehérjék és enzimek mennyisége vagy jelenléte (korai jelei sok nehézfém, rovarölő és gyógyszermaradék jelenlétének), illetve a nukleinsavak károsodásának mértéke szokott lenni, de ezek mellett gyakran szerepel a ROS mérés valamelyik változata (Guo & Feng., 2018). A specifikus ROS ártalmatlanító kapacitás gyakran összefügg más sejtszintű végpontokkal, mint a lizoszóma membránstabilitás vagy a DNS károsodás, ezért bár igen érzékeny, de biológiailag kevésbé releváns, mint a TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity), amely számszerűsíti a

szervezet teljes ROS-szerű hidroxil- és peroxilgyök semlegesítő képességét. Az oxidatív stressz további mérőszáma lehet a kataláz aktivitás (Cat), a lipidperoxidáció egy végtermékének (pl. malondialdehid) feldúsulása illetve a fehérjék oxidációjának mértékeként a fehérjék karbonil tartalma (Falfushynska et al., 2013). Számos szennyezőanyag hatására megnövekedik a glutation (GSH) koncentráció is, ami a szabadgyökök detektora a szervezetben. A szennyezők, eltérő hatásmechanizmusuk miatt a glutation metabolizmus különböző pontjaira hathatnak; markerük lehet a total glutation, a glutation reduktáz vagy a glutation S-transzferáz mennyisége, valamint a glutation peroxidáz aktivitás is (Guidi et al., 2010; Falfushynska et al., 2013).

A biomarkerek többsége nem specifikus, vagyis nem köthető kifejezetten egy fajta szennyezőhöz, inkább csak a külső összterhelés mértékét mutatja. Vannak azonban specifikus markerek is, amelyeknek egy konkrét anyag vagy anyagcsoport kimutatásában lehet szerepük. Ilyen a metallothionein (MT) fehérje, amelyet a kagylók szervezete egyes nehézfémek jelenlétére kezd termelni, hogy a fémekhez kapcsolódva megkösse és ártalmatlanná tegye őket (Pilote et al., 2018).

A hormon tartalmú gyógyszerekből a vizelettel a szennyvízbe jutó anyagok eltávolításának hatékonysága sok szennyvíztisztító esetében nem megfelelő, így a hormonok jelenléte bizonyos befogadó élővizekben jelentős. Az ösztrogén élővízben való jelenlétét mutatja a vitellogenin (Vtg) fehérje megjelenése a hemolimfában és az ivarmirigyben (Leonard et al., 2017).

Mivel az egyes biomarkerek külön-külön nem tükrözik a szervezet egészségi állapotát, a vegyi anyagok biológiai hatásának realisztikusabb értékeléséhez és az ilyen változások során lejátszódó mechanizmusok felismeréséhez egy válaszfelhő alkalmazása szükséges. A multibiomarker-megközelítés alkalmazása nagyban segíti a szennyezésre adott biokémiai és sejtszintű válaszok összetettségének megértését, valamint megvizsgálja az ezen biológiai változások megjelenése mögött húzódó mechanizmusokat (Guidi et al., 2010).

1.5. *In situ* és *ex situ* vizsgálatok

Az *ex situ*, laboratóriumban végzett vizsgálatok célja általában valamilyen toxikus anyag azon koncentrációjának és az expozíció idejének meghatározása, amelyek mellett az anyag detektálható hatást vált ki a tesztszervezetben (Rand, 1995). Ezeknek a teszteknek az eredményeit gyakorta használják a vizsgált anyag környezeti koncentrációjának megállapításához, illetve a várható hatások felméréséhez (Weber, 1991).

Nagy előnyük, hogy könnyen standardizálhatóak. A szabvány vagy protokoll kitér a módszer menetére, a tesztszervezet jellemzőire és a kapott adatok kiértékeléséhez szükséges statisztikai

elemzésekre is. Az ilyen módon elvégzett tesztek jól összehasonlíthatóak egymással, hiszen a világ egyik felén pont olyan laboratóriumi körülményekkel dolgoznak, mint a másik felén. Sok esetben azonban a laboratóriumi vizsgálatok eredményei nem extrapolálhatók valós környezeti helyzetre (La Point & Waller, 2000).

Az *in situ* tesztek lényege, hogy a tesztszervezetet közvetlenül a természetes környezetben vizsgáljuk, ahol az expozíció valós környezetben zajlik, és az eredmény a laboratóriumi vizsgálatoknál realisabb körülmények hatását mutatja. Ahelyett, hogy minden tényezőt, ami hatással lehet az eredményre megpróbálunk adott szinten tartani, hogy a tesztszervezet reakciója egyértelműen a vizsgált toxikus anyagra adott válasz legyen az *in situ* tesztek során az egyéb környezeti faktorok változása is jelentős befolyással bír (USEPA, 1994).

A két legfontosabb paraméter vízi környezetben, amit laboratóriumi vizsgálatokban kontroll alatt tartunk, *in situ* mérésnél azonban nincs rá hatásunk a hőmérséklet és az oldott oxigén tartalom, amelyek bizonyítottan hatással lehetnek a teszt kimenetelére. Maga a vizsgált stresszor is jelentősen eltérhet *ex situ* és *in situ* mérés esetében. Laboratóriumban egy választott koncentráció vagy koncentrációsor hatását vizsgáljuk, míg a környezetben a tényleges koncentrációt sok faktor befolyásolja, gyakran folyamatosan változik. Elsősorban folyóvizek esetében kell számolni a szennyezők összetételének ill. koncentrációjának esetlegesen gyors változásával (Štambuk et al., 2009).

Az *in situ* vizsgálatoknál alkalmazhatunk az adott élőhelyen megtalálható ill. kihelyezett kagylókat. Az élőhelyről begyűjtött kagylókon alapuló környezettoxikológiai vizsgálatoknak Európában legnagyobb volumenű alkalmazása a Duna állapotfelmérését célzó Joint Danube Survey volt. Ennek keretében Kolarević és et al.. 68 mintavételi helyről gyűjtött kagylókból vett mintákon (*Unio sp. /Unio pictorum/Unio tumidus/* és *Sinanodonta woodiana*) végezte el a Comet tesztet az esetleges genotoxikus komponensek jelenlétének megállapítása céljából (Kolarevic et al., 2016).

A kihelyezett kagylók esetében számolhatunk azzal az előnnyel, hogy a vizsgálati pontot (mintavételi helyet) magunk választjuk meg, míg a természetes élőhelyről gyűjtött kagylók esetében a természetes előfordulást az élőhely jellemzői is befolyásolhatják (Arbuckle & Downing, 2002). Mivel a kihelyezett kagylók még nem adaptálódtak az adott mintavételi ponton előforduló szennyező komponensekhez, relatíve érzékenyebbek lehetnek (Regoli & Principato, 1995). Ugyanakkor számolni kell a kihelyezett eszközök (pl. ketrec) megrongálódásával.

Talán a leglényegesebb különbség, hogy a kihelyezett kagylók esetében magunk választjuk meg az expozíciós időt. Az *in situ* transzplantált kagylót alkalmazó vizsgálatok során meglehetősen

eltér az egyes szerzők által alkalmazott expozíciós idő, továbbá a párhuzamosok (egy minta értékelésekor alkalmazott kagylók) száma. Guidi és et al. (2010) a Cecina folyó és a Possera patak (Olaszország) szennyezettségének feltérképezésére *U. pictorum* egyedeket használt (55-75 mm mérettartományban), amelyeket a Maggiore-tóból (Észak-Olaszország) gyűjtöttek. Gyűjtés után a kagylókat közvetlenül felhasználták, az egyes pontokra 15-15 kagylót helyeztek ki, 4 hetes expozíciós idővel márciusban. Egy másik kutatócsoport szintén *U. pictorum*-ot alkalmazott (mérettartomány 60-78 mm), 3 hetes expozíciós idővel októberben, mintavételi pontonként 30 egyed kihelyezésével (Štambuk et al., 2009). Vuković-Gačić és et al. (2014) *U. pictorum* és *U. tumidus* kagylókat alkalmazott (mérettartomány 70-100 mm). Vizsgálatukban a begyűjtött egyedeket 10 napos akklimatizáció után helyezték ki, mintavételi pontonként 40 egyed, 30 napos expozícióval. Az elemzés céljára a kagylókból hemolimfa mintát 7, 14 és 30 nap után vettek. A vizsgálatot április 14-május 15 között végezték a Duna és a Száva horvátországi szakaszán.

Természetes élőhelyükről gyűjtött kagylók esetében az expozíciós idő általában nem ismert. Ez alól kivételt jelenthet, ha egy adott időpontban bekövetkezett szennyezés okozta környezeti kárt minősítünk utólag. Erre elsősorban tengeri környezetben találunk példákat, amikor is olajszennyezés utáni környezetállapot-értékelést, esetlegesen több éves monitorozást végeztek. Európai viszonylatban legismertebb példa a Prestige olajszállító hajó 2002-ben a spanyol partoknál bekövetkezett katasztrófája, amelynek során a Biscayai- öbölnél több mint 1000 km-es partszakasz szenvedett károsodást. A környezeti katasztrófát több éves monitorozás – Mussel Watch – követte (Marigómez et al., 2013). Édesvízi környezetben általában az adott élőhely állapotának, ill. a szennyezés(ek) okozta hatások térbeli kiterjedésének értékelésére alkalmazzák ezt a megközelítést (ld. a már említett Joint Danube Survey programot).

A kék kagylót (*Mytilus edulis*, Linnaeus, 1758) tengerparti szennyezések monitorozásához vizsgálták több lehetséges végponttal, sokféle stresszorra, különböző helyzetekben. Ez az egyik legjobban leírt tengeri kagylófaj, az érzékenysége így széleskörűen ismert, aminek köszönhetően jelentős szerepet játszik a legfontosabb szennyezők regionális és helyi tendenciáinak nyomon követésében, valamint a veszélyes anyagok tengerparti víztestekbe való kibocsátásáért felelős iparágak megfeleléségi ellenőrzésében. Beyer és et al. (2017) tanulmánya felhívja a figyelmet arra, hogy a kiválasztott tesztszervezetnek a koncentrációs szintekhez kell igazodnia, vagyis elég érzékenynek kell lenni, hogy a forrástól távol eső területeken is kimutassa a szennyezőanyag hatását. Egy kutatócsoport az USA-ban található Clinch folyón az ott eredetileg is megtalálható kagylókat vizsgálta a közeli szénbányászat hatásainak feltérképezésében. A folyót viszonylag alacsony koncentrációban több nehézfém is szennyezi

és megfigyelték, hogy ezek hatása a környezetből a kagylókba kerülve összeadódik (Rogers et al., 2018).

Összegezve, vízi környezetben történő *in situ* vizsgálatokhoz a legelterjedtebben alkalmazott tesztalanyok közé tartoznak a helytülő kagylók; viszonylag egyszerű hozzáférhetőségük és sok szennyezőre ismert érzékenységük teszi praktikussá lokális használatukat (Chappie & Burton, 2000). Egyes tényezők korlátozhatják a kagylók alkalmazását környezeti tesztekben, azonban körültekintő tervezéssel ezek kiküszöbölhetők. Fontos, hogy a teszthez használt kagylók állapota jól ismert legyen. Lehetőleg ellenőrzött gazdálkodásból, kagyló farmról vagy bizonyítottan tiszta környezetből származzanak. A kihelyezésnél figyelembe kell venni, hogy ott természetes módon előfordul-e a választott faj, hogy elkerüljük a mesterséges terjesztéssel járó inváziós kockázatokat. Mindemellett a végpont megválasztását is át kell gondolni. A nagyobb méretű kagylók jobb tesztalanyok, azonban lassabban nőnek és szaporodnak, a mortalitás vizsgálata, mint végpont pedig lehetőleg elkerülendő (Farris & Van Hassel, 2006). A szubletális végpontok közül mérhetjük a filtrációs rátát, héj nyitás/zárást, biokémiai markereket (Salánki & V.-Balogh, 1989), de szövetminta vételére is létezik non-letális módszer (Naimo et al., 1998). A kagylók kiválasztásánál számításba kell venni, hogy a különböző fajok érzékenysége eltérő, de egy fajon belül is vannak különbségek az egyedek méretétől és korától függően (Metcalf-Smith, 1996).

Természetesen az *in situ* teszteknek is megvannak a maga korlátai. Számolni kell ismeretlen eredetű stresszorok hatásával és a lokális körülményekkel. Mivel a mérések környezeti paramétereit nem befolyásolhatjuk, minden mérés eltérő körülmények között történik, így az egyes mérések eredményei nem összehasonlíthatóak és a kiértékeléshez referencia vagy környezeti háttér adatok szükségesek (Pereira et al., 2000).

1.6. DNS károsodás fajtái és kimutatása

1.6.1. Genotoxicitás

A DNS károsodás a DNS alapszerkezetében bekövetkezett változásból ered, ami módosított fehérjefunkcióhoz, inaktivitáshoz és genetikai mutációkhoz vezethet. A DNS károsodás történhet kémiai addícióval, a bázissorrendben bekövetkezett változással vagy lehet törés a DNS lánc egyik vagy mindkét szálában. Mutációnak a DNS-ben végbemenő mennyiségi vagy szerkezeti változást nevezzük, amely nem magyarázható az eredeti genetikai anyag rekombinációjával és öröklődhet. A genotoxikus anyagok közvetlen hatással lehetnek a génekre

és a génexpresszióra, de közvetlen hatást is kifejthetnek a génfrekvenciára (Bierkens et al., 2005).

A teljes genetikai állományban bekövetkező, és kijavítódó, vagy nem manifesztálódó DNS károsodások nagyon gyakoriak, az emberi sejtekben is több tízezer DNS károsodás történik naponta részben spontán, részben környezeti hatások miatt (Bernstein et al., 2013). A DNS folyamatosan kapcsolatban van vízzel és oxigénnel, amik spontán hidrolitikus és oxidatív károsodást okoznak, a pH és hőingadozások hatására pedig a bázisok amino csoportja válhat le (dezaminálás), ami szintén okozhat mutációt. Külső hatásnak tekinthető az ionizáló sugárzás, amely hatására gerjesztett és ionizált molekulák alakulnak ki és véletlenszerűen károsíthatják bármely sejtösszetevőt, így számos DNS-elváltozást indukál. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a szervezetet érő sugárterhelés nagy része természetes eredetű (pl. kozmikus sugárzás, alapkőzet sugárzása, természetes radioaktív izotópok) és csak kis részben antropogén eredetű (pl. Röntgen-sugárzás, mikrohullámú sugárzás, sugárterápia) (Friedberg, 2003).

Bár vannak önjavítási mechanizmusok a DNS károsodások kijavítására, ezek nem működnek 100%-os hatékonysággal. Ezek a repair folyamatok általában képesek lépést tartani a sejtek replikációjával járó endogén károsodásokkal, részben azzal, hogy megállítják a DNS-replikációt a sérülés helyén, amíg a javítás meg nem történik. Ezzel ellentétben a nem replikálódó sejtekben történő DNS károsodások felhalmozódnak, ami siettet a sejt öregedését. Egyes exogén vegyületek, mint például a dohányfüstben lévő anyagok, túlterhelhetik a javítási útvonalat, magasabb szintű DNS károsodást okozhatnak, mint az endogén anyagok vagy újfajta hibákat hozhatnak létre, amelyeket lassabban lehet kijavítani. A DNS javítási útvonalak hiányossága vagy hibái egyes károk nem kerülnek javításra, felhalmozódnak és nagyobb hibákat, mutációt okoznak. A gyakori mutációk aktiválják az onkogéneket, amelyek elősegítik a sejt tumorsejtté válását, valamint inaktíválják a tumorszupresszor géneket és ezzel növelik a rák kialakulásának kockázatát (Bernstein, et al., 2013).

A DNS károsodást szenvedett sejtek javítás hiányában általában inaktívódnak, melynek leggyakoribb formája az apoptózis. Az ezt kiváltó specifikus DNS károsodások közé tartoznak az O⁶-metil-guanin képződése, a bázisok N-alkilációja, a nagyméretű DNS-adduktumok, a DNS-keresztkötések és a kettős szálú DNS törések, amelyek döntő jelentőségűek az apoptózis kiváltásában (Roos & Kaina, 2006).

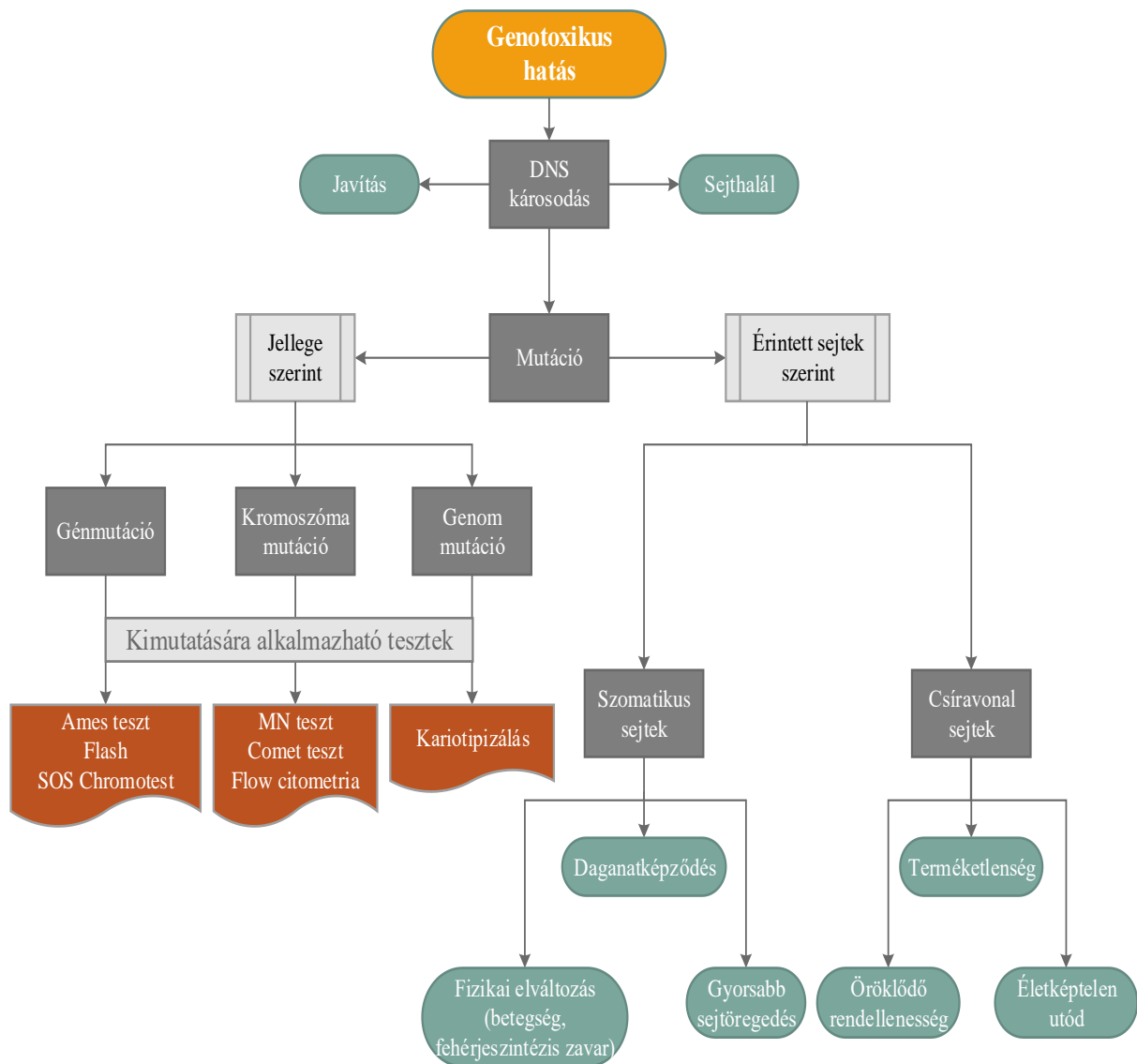
1.6.2. DNS károsodás formái

DNS károsodás előfordulhat bármely sejtben, a sejtciklus bármely szakaszában és érinthet egyetlen gént, gén szakaszt vagy akár egész kromoszómát. A leggyakrabban előforduló DNS

károsodás a pontmutáció, ami legfeljebb néhány bázist érint. Ez történhet úgy, hogy egy rövid DNS szakasz duplán íródik át a replikáció során (duplikáció), egy szakasz kiesik (deléció), egy szakasz beékelődik a génbe (inszerció) vagy pedig két DNS szakasz megcserélődik (szubsztitúció) (Bierkens et al., 2005). A pontmutációk különleges esete az úgynevezett frameshift mutáció, amikor a kiesett vagy betoldott bázisok száma nem egyenlő hárommal, ilyenkor ugyanis a mutáció helyétől a transzkripció leolvásás irányában megváltozik a kódolt információ (Falus et al., 2014).

Abban az esetben, ha a bekövetkezett változás magát a kromoszóma szerkezetét érinti, kromoszóma mutációról beszélünk. Ez általában, de nem kizárólag meiózis alatt következik be és hátrányosan érintheti az egyedtet. A végbemenő folyamatok nagyjából ugyanazok, mint a pontmutációk esetében is, csak itt DNS szakaszok helyett kromoszóma darabok duplázódhatnak meg (duplikáció), veszhetnek el az átírás alatt (deléció), csatlakozhatnak egy másik kromoszómához (transzlokáció) vagy előfordulhat, hogy egy szakasz fordítva íródik be oda, ahol egyébként a helye lenne (inverzió) (Bierkens et al., 2005).

Ez eddigiekénél ritkább, de súlyosabb a genom mutáció, ami a kromoszómaszám megváltozását jelenti. A testi sejtekben végbemenő genom mutáció eredménye általában daganatképződés és az érintett sejtek normális működésének megszűnése, de a rendellenesség nem öröklődik át a következő generációra. Amennyiben viszont a mutáció az ivarsejteket vagy a csíravonalat érinti, a hatás átöröklődik az utódokra. Ez sok esetben életképtelen embriót vagy abnormális fejlődést okoz, mint több ismert szindrómánál (pl. Down-kór, Turner-szindróma) (Theisen & Shaffer, 2010; Bierkens et al., 2005). A DNS károsodás érintett sejtek szerinti lehetséges kimeneteleit, valamint az egyes mutáció fajták kimutatására alkalmazható tesztek az alábbi ábra szemlélteti (3. ábra).



3. ábra: A DNS károsodás lehetséges kimenetelei és az egyes mutáció fajták kimutatására alkalmas tesztek (példák)

Egy más szemszögből a genotoxikus hatások csoportosíthatók úgy, mint közvetlen és közvetett folyamatok. A közvetlen genotoxicitás egy vegyület DNS-sel való kölcsönhatását jelenti. Ezek az elsődleges okai a génmutációnak és a DNS lánc töréseknek, melyek szerkezeti kromoszóma károsodásokat okoznak. Ezzel szemben a közvetett hatások során a vegyületek valamilyen nem DNS anyaggal lépnek kapcsolatba, így generálva genetikai károsodást. Ilyen mechanizmus a DNS szintézis gátlása, a nukleotid egyensúly zavara, a topoizomeráz enzim gátlása valamint kihatással lehet a belső testhőmérséklet változására. A közvetett genotoxikus folyamatok az elsődleges okai a kromoszóma számot érintő elváltozásoknak. A közvetlen hatást kiváltó genotoxikus anyagoknak nincs küszöbértékük, vagyis akár egyetlen molekula is kiválthat DNS károsodást, viszont a közvetett folyamatok során meg lehet állapítani ún. NOGEL értéket

(No Observed Genotoxic Effect Level), amely arra utal, hogy ilyen esetekben a genotoxikus anyag csak egy bizonyos küszöbérték felett fog károsodást okozni (Graziano & Jacobson-Kram, 2015).

1.6.3. Mikronukleusz teszt

Mikronukleuszok eukarióta szervezetekben jöhetnek létre rendellenes sejtosztódás során. Kromoszómatörés vagy osztódási orsó zavar esetén egy kromoszóma darab nem jut be az utódsejtekbe, hanem saját sejtmaghártyával körbevéve a sejtmag mellett jelenik meg. Ilyen folyamat ugyan természetesen is lejátszódhat, de a genotoxikus anyagok hatására a mikronukleuszok a normálnál jóval nagyobb számban jelenhetnek meg. A mikronukleusz gyakorisággal jellemezni lehet az adott egyedet ért genetikai károsodás mértékét. A genotoxikus anyagok és a hatásuknak kitett szervezetben lévő mikronukleuszok száma közötti összefüggést már az 1970-es években leírták, majd a '80-as évektől kezdve fel is használták egyedi szennyezők, ill. komplex környezeti mátrixok genotoxicitásának minősítésére (Von Ladebur & Schmid, 1973; Schmid, 1975; Das & Nanda, 1986). Mivel mikronukleuszok keletkezhetnek akár szomatikus, akár germinális sejtekben, a tesztet bármilyen élő szöveten el lehet végezni (Bolognesi et al., 2004).

A mikronukleuszok képződését, így a teszt érzékenységét számos olyan paraméter befolyásolhatja, mint a faj, a kor, a nem, vagy a reprodukzív állapot, azonban a tesztalanyok körülményeitől megválasztásával ezek nagy része kiküszöbölhető. Általánosságban megfigyelhető, hogy a fiatalabb egyedek érzékenyebbek, mint az idősebbek, mivel a korai fejlődési szakaszban az egyedek sérülékenyebbek. A faj kiválasztásánál a környezeti relevancia mellett a kariotípusnak (a kromoszómák számának, méretének és alakjának) lehet meghatározó szerepe. Célszerű olyan fajt választani, aminek kevesebb, nagyobb méretű kromoszómái vannak, a kis méretű kromoszómákból képződő mikronukleuszok ugyanis sokszor olyan kicsik, hogy nem láthatóak fénymikroszkóp alatt. Új anyag vizsgálatánál vagy új faj alkalmazása esetén célszerű a negatív kontroll mellett egy pozitív kontrollt is használni. Bár mikronukleusz tesztet gyakorlatilag bármilyen szöveten el lehet végezni, a leggyakoribb a vér vagy hemolimfa sejtek vizsgálata, mivel az ebből vett kis mennyiségű minta hiányát az egyedek gyorsan pótolják. A teszt kivitelezése során fontos az expozíciós idő hosszát a mintázni kívánt sejtek replikációs ciklusa és élelciklusa alapján megválasztani. (Udriou, 2006).

Bár nem szabványszinten definiált, de bevált, ellenőrzött tesztprotokollok léteznek kagyló mikronukleusz teszt elvégzésére (Woznicki et al., 2004). A mikronukleusz teszt széles körben való alkalmazhatóságának oka a módszer rugalmasságának és a pontos kivitelezés számos

lehetőségének köszönhető. Egyaránt elvégezhető növényeken, gerinctelen állatokon (pl. földi giliszta, kagyló), alacsonyabb rendű gerinceseken (pl. kétéltűek, hüllők, halak) és emlősökön (pl. rágcsálók, ember). A lóbabra (*Vicia faba*) kifejlesztett mikronukleusz tesztet érzékenysége, megbízhatósága, költséghatékonysága és könnyen kezelhetősége miatt elterjedten alkalmazzák talajminták (talaj, üledék, komposzt, hulladék stb.) genotoxikus karakterének meghatározására (Degrassi & Rizzoni, 1982; Ji & Chen, 1996; Foltête et al., 2011); ennek köszönhető a teszt szabványosítása is (ISO 29200:2013). Létezik leírt módszer kajmán embriók alkalmazására, amelyeknél a kikelés után vett vérmintát vizsgálták (Poletta et al., 2009), varangyosbéka ebihalak szívéből vett vérminta tesztelésére (Yin et al., 2009), valamint halak veséjéből vagy uszonyából gyűjtött vér vörösvértestjeinek vizsgálatára is (Udriou, 2006; Deutschmann et al., 2016). Ahhoz, hogy a tesztek eredményeit emberre extrapoláljuk sokszor szükség van az emlősökön végzett tesztekre is, amelyeket általában rágcsálókön végeznek. Ennek a menetét az OECD Test Guideline 474 szabvány írja le, ami kiterjed mind a gerincvelő sejtekkel, mind a perifériás vér sejtjeivel végzett teszt módszerre *in vivo* expozíció esetén (OECD Test No. 474). Az *in vivo* tesztek mellett léteznek sejtvonalas módszerek is, amellyekkel úgy végezhetjük el a vizsgálatokat (általában magasabb rendű állatokon vagy emberen), hogy közben nem merülnek fel etikai problémák, hiszen tenyésztett sejteket használunk. Erre szabványosított módszer az OECD Guideline 487, amely rágcsáló vagy humán sejt kultúrán vizsgálja a tesztelt anyag genotoxikus hatását (OECD Test No. 487). A sejtvonalas módszerek nagy előnye, hogy az *in vivo* tesztekhez képest gyorsabban és egyszerűbben elvégezhetőek. A metabolikus aktivitás pótlására S9 aktivációt lehet végezni rajtuk, azonban a szervezet egyéb immunválaszainak szimulálására nincs lehetőség, így bár érzékenyebb az *in vivo* tesztekhez képest, de kevésbé releváns eredményt adnak (Kirsch-Volders et al., 2011; Kotova et al., 2015). Puhatestűek esetében permanens sejt vonal létrehozására még kevés példa van, de a primer sejt vonalak létrehozása viszonylag egyszerűen megoldható (Faucet et al., 2003; Labieniec et al., 2003; Parolini et al., 2011). Ez a módszer kiküszöbölheti a tesztállatok gyűjtése során felmerülő problémákat is, mivel az *Unionidae* családba tartozó fajok jelentős részénél nem megoldott a mesterséges szaporítás. Egy *U. tumidus* egyedeken és a hemolimfájukból készített sejt kultúrán egyaránt elvégzett gyógyszervizsgálat során az *in vivo* módszer adott csak szignifikáns választ (mindkettőt Comet teszttel végezték), míg az *in vitro* módszer valószínűleg a hemociták osztódásának hiánya miatt nem mutatott ki DNS károsodást. Ebből is látható, hogy a sejttenyészeteken végzett tesztekhez képest milyen körültekintően kell megtervezni a kísérletet és megválasztani a paramétereket (Gačić et al., 2014).

Mivel a tesztalany megválasztására számos lehetőség van, a mikronukleusz teszt egyaránt alkalmazható talaj, levegő vagy üledék minták illetve vízszennyezők esetében is. Vízszennyező komponensek valamint környezeti vízminták genotoxicitásának meghatározására leggyakrabban kagylókat alkalmaznak. Mivel ez a módszer nincs szabvány szinten definiálva, különböző metodikák léteznek. Kis méretű kagylók esetében – amelyekből nem lehet a vizsgálathoz szükséges mennyiségű hemolimfát gyűjteni – kopoltyú sejtekből vesznek mintát. Ennek meg van az az előnye, hogy a kopoltyú sejtek érzékenyebben reagálnak a genotoxikus anyagokra, mint a hemolimfa sejtek, így kisebb koncentráció hatásának kimutatására is alkalmasak, ugyanakkor ez a módszer a kagylók pusztulásával jár. (Bolognesi et al., 2004). Az elterjedtebb módszer során, amelyet én is alkalmaztam a vizsgálataimban, a kagylók *posterior adductor* izmából vett hemolimfa minta sejtjeit elemzik. Eltérések itt is vannak, többnyire az expozíciós idő és az egyedenként leszámolt sejtek tekintetében. Egyes esetekben már 1 nap expozíció után szignifikáns növekedést lehet tapasztalni a mikronukleusz számban, azonban ezt valószínűleg csak a közvetlen hatású és gyors metabolizációjú szennyezők váltják ki (Pinto-Silva et al., 2003). Más vizsgálatok azt mutatják, egyszeri szennyezés esetén a mikronukleuszok száma a 4. napon van maximumon, ezután már csökken, míg folyamatos szennyezés esetében a mikronukleusz szám is folyamatosan nő, bár egyre kisebb ütemben (Woznicki et al., 2004; Siu et al., 2004). Az egyedenként leszámolt sejteket 1000 és 4000 közé választják meg, amit a genotoxikus hatás várt erőssége szabhat meg. Amennyiben a kimutatni kívánt hatás várhatóan gyenge, akkor szükség lehet a 4000 sejtre egyedenként, hogy szignifikáns eltérést mutathassunk ki, azonban az esetek többségében az 1000-2000 sejt leszámolása elegendő (Pinto-Silva et al., 2003; Woznicki et al., 2004; Bolognesi et al.; 2004).

Célkitűzések

Munkám során a kagyló MN teszt alkalmazhatóságának vizsgálata volt a fő céлом. Ennek érdekében vizsgálataimat az alábbi célkitűzések köré csoportosítottam:

1. A vizsgálati paraméterek hatása a MN számra:

Fajspecifikus érzékenység: Kagyló MN teszt elvégzéséhez a szakirodalom számos kagylófajt használ, melyek kiválasztásánál jelentős szempont a környezeti relevancia, vagyis, hogy az adott faj az érintett területen megtalálható legyen. Vizsgálataimban két kagylófajt alkalmaztam tesztanyagként, melyek a Balatonban őshonos *Unio pictorum* és az invazív *Sinanodonta woodiana* voltak. Céлом volt meghatározni és összehasonlítani a két faj rézszulfátra és benzapirénre mutatott érzékenységét. Nullhipotézisem szerint amennyiben a *S. woodiana* érzékenyebb vagy legalább megfelelően érzékeny, genotoxicitás tesztekben kiválthatja a védelmet élvező őshonos *U. pictorum*-ot.

Expozíciós idő: A szakirodalomban a kagyló MN teszthez különböző expozíciós időket találunk mind a laboratóriumi (*ex situ*), mind a terepi (*in situ*) méréseknél. Az egyes vizsgálatok eredményeinek összehasonlíthatósága érdekében céлом volt meghatározni, hogy a kapott MN szám kialakulásában mekkora szerepe van az expozíciós időnek.

Egyedek mérete: A kagylók különböző életszakaszaikban eltérő érzékenységgel reagálhatnak bizonyos szennyezőkre. Céлом volt feltárni a kapott MN számok és a kagylók mérete (hosszúság, vastagság, szélesség, súly) közötti kapcsolatot.

2. A kagyló MN teszt érzékenységének meghatározása összehasonlítva más genotoxicitás tesztekkel:

A kagyló MN teszt érzékenységének összevetése baktérium tesztekkel: Genotoxicitás minősítésre a legelterjedtebben alkalmazott módszerek az SOS Chromotest és az Ames teszt. Vizsgálataim során céлом volt meghatározni a MN teszt ezekhez viszonyított érzékenységét már ismert genotoxikus hatású szennyezőkre.

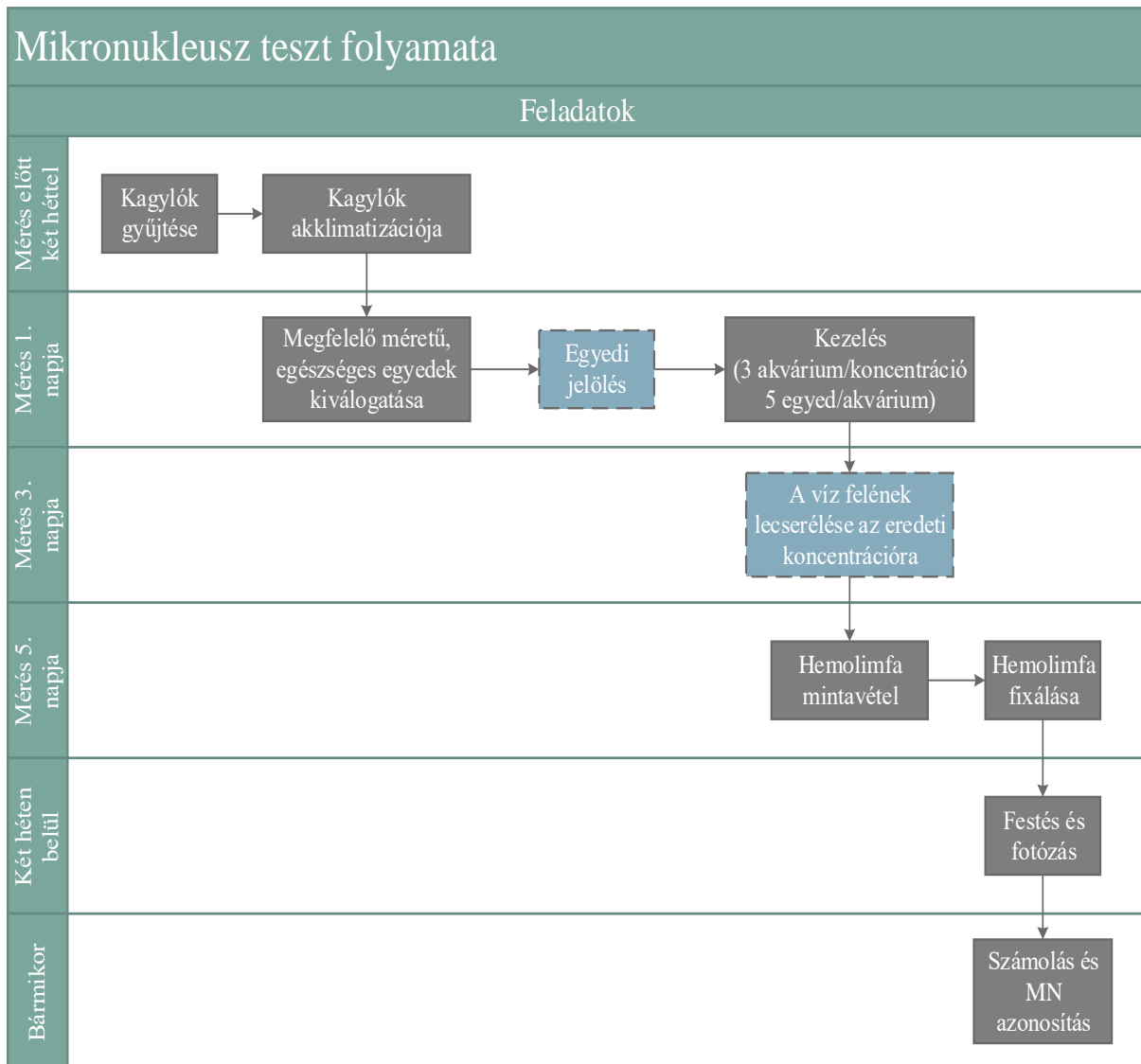
A kagyló MN teszt érzékenységének összevetése Flow citometriás méréssel: A Flow citométerre adaptált kansperma teszt megfelelő festési eljárás mellett képes genotoxikus károsodás kimutatására. Munkám egyik célja a kagyló MN teszt és a Flow citometriás módszer érzékenységének összehasonlítása volt biodízel és gyógyszergyári szennyvíz mintákra.

3. Általánosságban célul tűztem ki olyan környezeti minták vizsgálatát, amelyek genotoxikus potenciálját kagyló MN teszttel még nem, vagy csak kis mértékben vizsgálták. Az ilyen jellegű tesztek segítségével véleményem szerint átfogó képet kaphatunk a kagyló MN teszt érzékenységéről.
4. *In situ* kísérlet során vizsgálni kívánom, a kagyló MN teszt milyen mértékben alkalmazható monitoring jelleggel természetes vizek szennyezettségének vizsgálatára, ill. a kísérleti körülmények mennyiben befolyásolhatják a vizsgálat menetét, az eredmények megbízhatóságát.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Mikronukleusz teszt

A mikronukleusz teszt elvégzése a kagylók beszerzésétől a teszt kiértékeléséig több lépésből áll. Ezek átláthatóságát segíti az alábbi ábra (4. ábra), amelynek egyes részeit a következő alfejezetekben mutatom be részletesebben.



4. ábra: A mikronukleusz teszt folyamatábrája

2.1.1. Kagylók gyűjtése és tartása

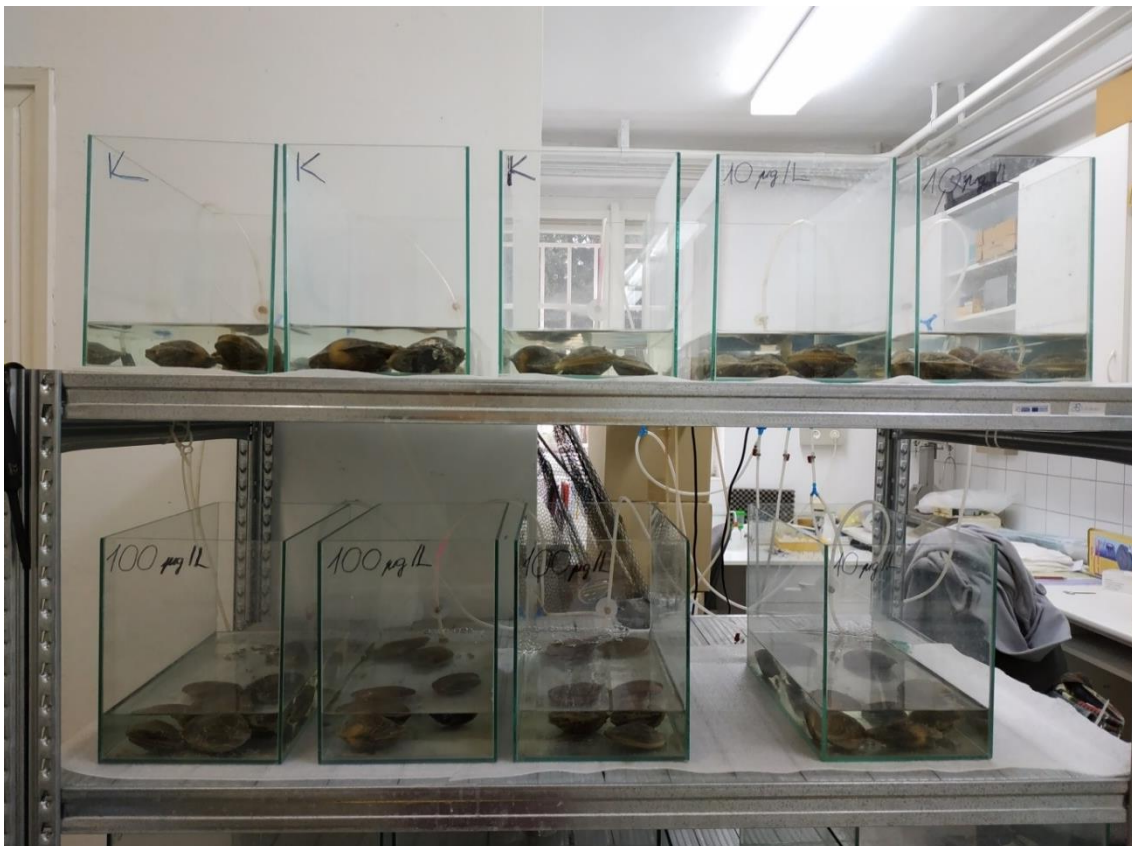
A mikronukleusz teszteket festőkagyló (*Unio pictorum*), valamint amuri kagyló (*Sinanodonta woodiana*) egyedeken végeztem, amelyeket a Balatonból gyűjtöttünk. Több kagylógyűjtés is

történt, de minden esetben a Keszthelyi-öbölből származtak a kagylók, amelyeket egy motorcsónakról vontatott mintavevő eszköz segítségével gyűjtöttünk be. A kagylók közül még a motorcsónakban kiválogattam a felhasználni kívánt fajokat és megszabadítottam a rátapadt vándorkagylóktól.

A kiválasztott kagylókat (egyszerre kb. 100 egyedet) az MTA Ökológiai Kutatóközpont és Balatoni Limnológiai Intézetének (Tihany) akváriumszobájában tároltam egy átfolyásos medencében 4 héten át a tesztek előtt.

2.1.2. Kezelés

A kezelés kezdetén átválogattam a kagylókat, hogy csak egy meghatározott mérettartományba eső egyedeket használjam. Ez nagyjából a 6-8 cm hosszú kagylókat jelenti, amiket a tesztakváriumokban egyenletesen osztottam el, azonban néhány mérésnél (cserszömörce, biodízel, réz szennyezőknél, illetve az *in situ* mérés esetében) pontosan fel is jegyeztem kagylók a hosszát, szélességét, vastagságát és súlyát, majd egyedileg jelöltem őket és csak ezután osztottam el őket az akváriumokban (5. ábra).



5. ábra: A kagylók elhelyezése az akváriumokban a mérés során

A kagylókat minden mérés során 3 l volumenű kísérleti vízben inkubáltam. Mivel a kagylók a Balatonból származtak ezért kontrollként, valamint a koncentrációk elkészítéséhez is Balaton vizet használtam. Minden koncentrációból 3 párhuzamos akvárium volt és mindegyikbe 5-5 kagylót helyeztem, így egy átlagos méréshez (kontroll, valamint négy tagú hígítási sor) 75 kagylóra volt szükségem.

A teljes expozíciós idő 4 nap volt (Woznicki et al. 2004), azonban figyelembe véve, hogy a vizsgált anyagok koncentrációja a tesztidő alatt csökkenhet (biológiai degradáció, fotolízis stb.), szemisztatikus módszert alkalmaztam. A víz felét két nap után kimertem az akváriumokból és ugyanolyan térfogatú, az eredeti koncentrációt tartalmazó oldattal töltöttem fel, így egy kvázi folyamatos terhelést szimulálva. Ilyen módon a metabolitok (az eredeti minta esetleges bomlása során keletkező, ismeretlen komponensek) által várható többlet toxicitást is kiküszöböltem.

A felhasznált Balaton víz miatt nem volt szükség a kagylók további etetésére, csupán a levegőztetést kellett biztosítani. A levegő hőmérséklete a tesztek alatt szobahőmérsékleten volt tartva ($t = 20-22^{\circ}\text{C}$) természetes fényciklus mellett.

2.1.3. Hemolimfa gyűjtése és fixálása

A 4 napos expozíció letelte után az egyedekből hemolimfa mintát vettem. A mintavétel a Gustafson et al. (2005) által leírt nem letális módszer alapján, annak továbbfejlesztésével történt. A fejlesztés lényege, hogy nem szükséges hozzá a kagylókat felnyitni, így nem csak a mintavevő személy számára lesz egyszerűbb és gyorsabb az eljárás, de a kagylókat sem éri felesleges stressz és sérülés. A mintavételhez használt fecskendőt a pánt mellett, a két héj között kell bevezetni – ahol csak egy vékony elszarusodott réteg van – így közvetlenül a hátulsó záróizomba (*posterior adductor*) szúrunk. A hemolimfa gyűjtés nem letális módszerét a 6. ábra mutatja egy *Anodonta anatina* egyeden.



6. ábra: Hemolimfa mintavétel a posterior adductor izomból a kagyló felnyitása nélkül

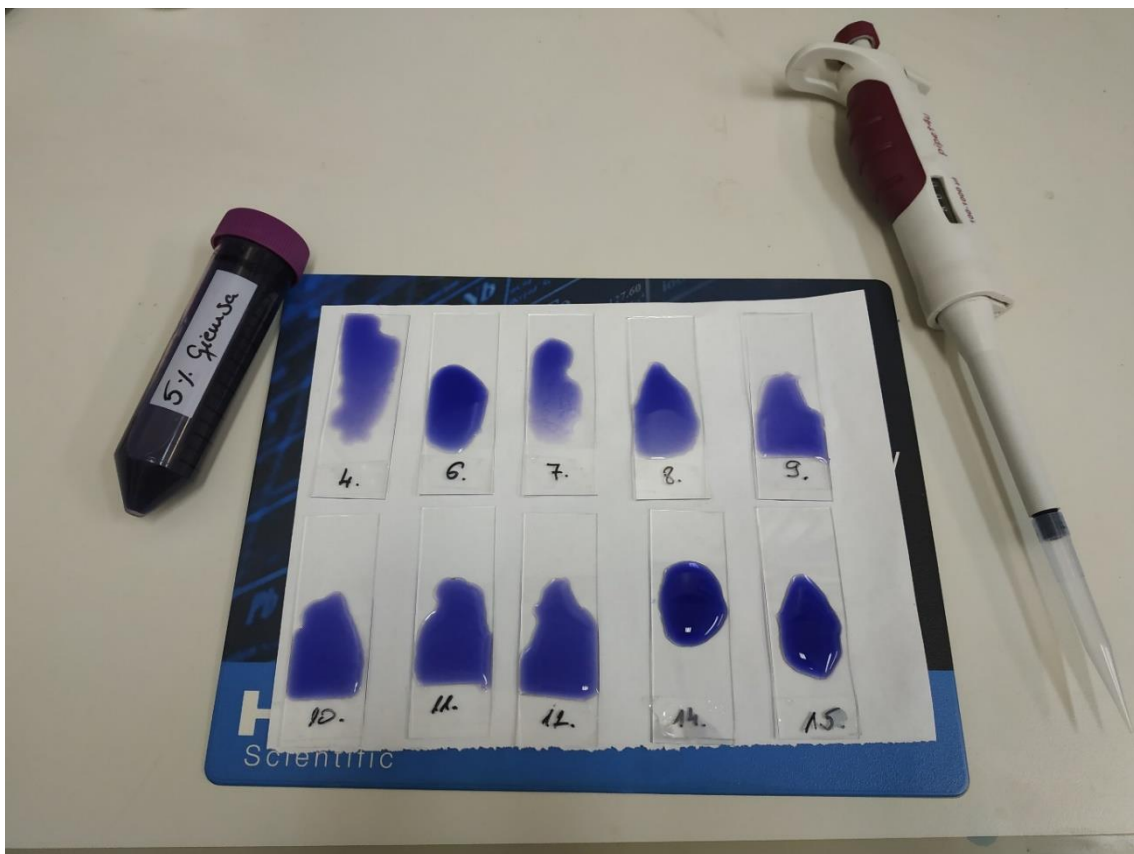
Egyedenként kb. 1 ml hemolimfa mintát gyűjtöttem, amely akár két vizsgálathoz is elég, hogy szükség esetén meg lehessen ismételni. A begyűjtött mintához 7:3 arányban 10%-os ecetsavas metanol adtam, majd 1000 rpm fordulattal 5 percig centrifugáltam. Ennek következtében a hemolimfa sejtek letapadtak a centrifugacső falára, így könnyedén le lehetett pipetázni a felülúszót, majd 1 ml 80%-os metanolban felfuszpendáltam a sejteket (7. ábra). Az így tartósított hemolimfa minták hűtőben kb. két hétig roncsolódás nélkül eltarthatók. (Gustafson et al. 2005)



7. ábra A hemolimfa minta fixálása későbbi felhasználásra

2.1.4. Festés és fotózás

A hemolimfa sejtek festéséhez a tartósított mintákat újra le kellett centrifugálni (1000 rpm, 5 perc), majd a felülúszó nagy részét lepipettáztam, hogy a maradék szuszpenzió minél koncentráltabban tartalmazza a sejteket. Ezután kb. 0,3 ml-t tárgylemezre cseppentettem, szabad levegőn beszárítottam majd 80%-os metanollal borítottam és újra hagytam beszáradni. Száradás után 5%-os Giemsa oldatot csepegtettem a letapadt sejtekre és 20 percig festettem (8. ábra). Végül a mintákról desztillált vízzel óvatosan lemostam a festéket amíg a mosófolyadék szintelen nem lett és még nedvesen fedőlemezt helyeztem rájuk. A tárgylemezeket egy számítógéppel összekötött, Zeiss AxioCam ICC1-es kamerával felszerelt Zeiss Axio-Scope A1 mikroszkóp alá helyeztem és 400-szoros nagyítás alatt minden mintáról elegendő képet készítettem ahhoz, hogy leglább 1000 hemolimfa sejtet azonosítani lehessen rajta (Gustafson et al. 2005).

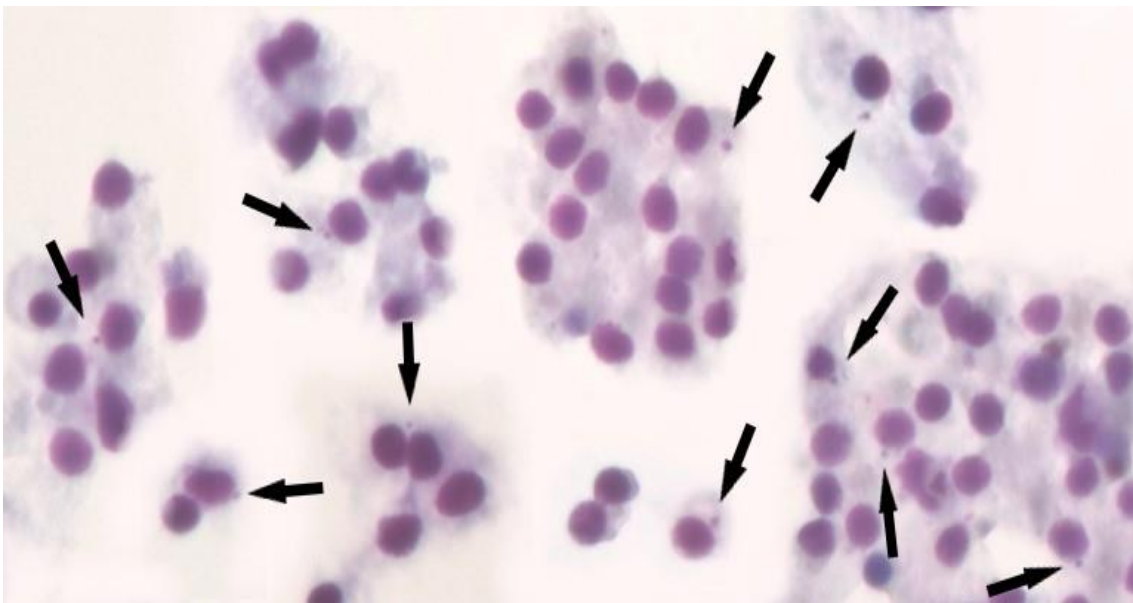


8. ábra: A tárgylemezre szárított hemolimfa minták festése

2.1.5. Mikronukleuszok azonosítása és számolás

A lementett képekről minden egyed esetében 1000 db sejtet számoltam le, jelezve, hogy mennyi volt közöttük a mikronukleuszos sejt. A mikronukleuszok azonosítását Bolognesi és Fenech által

leírtak alapján végeztem, így csak a jól elkülöníthető, ép membránnal rendelkező agranulocita sejteket számoltam. A nekrotikus és apoptikus sejteket nem vettem figyelembe. Mikronukleusznak azt a sejtmag mellett megjelenő testecskét tekintetem, ami kerek vagy ovális alakú, morfológiailag és színében a sejtmagra hasonlít, elkülöníthető a sejtmagtól (nem érnek össze) és mérete a sejtmag méretének 1/3-a és 1/16-a között van. Egy sejtmag mellett általában egy mikronukleusz van, de előfordulhat kettő vagy több is, bár az én vizsgálataimban ilyen esettel nem találkoztam (Bolognesi & Fenech, 2012). Az alábbi montázon (9. ábra) látható néhány példa a Giemsa festékkel megfestett hemolimfa sejtmagok mellett megjelenő mikronukleuszokról x400 nagyítás mellett.



9. ábra: A képen a fekete nyilak jelölik az általam is alkalmazott szempontok szerint azonosított mikronukleuszokat a hemolimfa sejtmagok mellett

2.1.6. Statisztika

A mikronukleusz tesztre kapott értékeken szignifikanciáját Tukey post hoc teszttel kiegészített egyszempontú ANOVA teszttel vizsgáltam, hogy megállapíthassam mely esetekben volt a kezelés hatása a kontrollhoz képest szignifikáns a mikronukleusz számra. Minden kísérleti koncentrációban 3 párhuzamosban 5-5 egyedet kezeltem, azonban a kiértékeléshez csoportonként csak annak a 10 egyednek az adatait használtam, amelyeknél a legjobb volt az elkészült képek minősége, így kisebb volt a MN azonosítási hiba valószínűsége. Az adatokon elvégeztem az ANOVA alkalmazhatóságának feltételeit ellenőrző teszteket (normális eloszlás – χ^2 -négyzet próba, varianciák homogenitása – Bartlett-próba, minták függetlensége, véletlen

mintavétel) de semmilyen transzformációt nem hajtottam végre rajtuk. A statisztikai vizsgálatokat az R szoftverrel végeztem.

2.2. Összehasonlító tesztek

A szennyvíz esetében alkalmazott egyik bakteriális tesztnek az SOS Chromotest-et választottam, amit a kibocsátott szennyvíz minőségének ellenőrzését – beleértve a genotoxicitás becslését – szabályozó 27/2005. (XII. 6.) KvVM rendelet is ajánl. Ez egy enzimátikus színreakción alapuló kolorimetriás módszer, amely az *Escherichia coli* PQ 37-es törzset alkalmazza. A törzsből a DNS károsodás az SOS javító gének helyett a β -galaktozidáz transzkripcióját iniciálja, a keletkező enzim mennyiségét fotométerrel meg tudjuk határozni. Az oldat abszorbanciája arányos a DNS károsító hatás mértékével (Quillardet & Hofnung, 1985). Az SOS Chromotest-et az OECD (Test No. 471) szabványban rögzítetteknek megfelelően végeztem el. A genotoxikus anyag SOS rendszerre gyakorolt aktiváló hatását az indukciós faktor (IF) fejezi ki, amit a negatív kontroll és a vizsgált minta abszorbancia értékeiből kell kiszámolni. Amennyiben a kapott IF érték 1,5 fölött van, a minta genotoxikus (Krafton, 2012). A kísérleteket S9 aktivációval kiegészítve végeztem el, amely mutagén kezeléssel aktivált patkány máj kivonat rendszerbe juttatásával az emlősök májában végbemenő metabolikus aktiválást hivatott modellezni. Az SOS Chromotest feltétlen előnye, hogy kit formájában, plétre kiszerelt változatban kapható. A kit értelemszerűen tartalmaz minden, a mérés elvégzéséhez szükséges anyagot, beleértve az S9 patkánymáj-kivonatot is.

A másik baktérium teszt a szennyvíz mintánál az Ames teszt volt. Az Ames teszt tesztorganizm egy genetikailag módosított *Salmonella typhimurium* törzs, amely hisztidin szintéziséért felelős génjeiben különböző mutációkat hordoz. A módszer alapja, hogy a genotoxikus anyagok a hisztidin auxotróf sejtek hisztidinintermelő képességét visszaállíthatják, így azok képesek lesznek növekedni hisztidinmentes táptalajon is (Ames et al., 1973, Jomini et al., 2012). Vizsgálataimban a fluktuációs Ames tesztet alkalmaztam, ami a módszer mikroplétre adaptált változata. Ebben a reakció végpontját a baktériumok szaporodása közben létrejövő savas kémhatású közeg jelzi, amely indikátorral színreakciót ad. A kiértékeléshez a genotoxikus hatásra az összes párhuzamos kút közül pozitív színreakciót adó kutak százalékos arányát kell megadni. Ilyen módon egyszerre nagyszámú minta tesztelésére van lehetőség, érzékenysége pedig a lemez inkubációs módszerét meghaladja (Curieux et al., 1995). Az SOS Chromotest-hez hasonlóan az Ames tesztet is S9 aktivációval végeztem.

A biodízel minta cito- ill. genotoxikus potenciáljának meghatározása ezenkívül Flow citometriás méréssel történt. A módszer sertés kan sperma sejtek különböző fluoreszcens festékekkel történő festésén alapul, ami így alkalmas az élő és holt sejtek elválasztására, valamint a DNS fragmentáció mértékének meghatározására is (Kakasi, 2019).

2.3. Vizsgálatok

2.3.1. Egykomponensű minták vizsgálata

2.3.1.1. Rézsulfát

A rézsulfát (CuSO_4) genotoxikus potenciálját már több szerző leköszölte (Yildiz et al., 2009; Guecheva et al., 2001; Popov et al., 2013). Bizonyított genotoxikus hatása miatt a kagyló MN teszt eredményét befolyásolható paraméterek (fajfüggés, expozíciós idő hossza, egyedek méretének hatása) vizsgálatát rézsulfáton végeztem el.

Az alkalmazott koncentrációkat a vonatkozó irodalmi adatok alapján határoztam meg (Nguyen et al., 2005). A hígítási sor koncentrációi a következők voltak: $0.125 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$, $0.25 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$, $0.5 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ és $10 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ rézsulfát oldat, valamint a kontrollként beállított Balaton víz. A koncentrációk elkészítéséhez szintén Balaton vizet használtam. Koncentrációnként 3 párhuzamos akváriumot vizsgáltam, a hosszabb tesztidő miatt a többi tesztnél alkalmazott 3 liter helyett mindegyikben 4-4 liter oldat és 5-5 egyedileg jelölt *U. pictorum* illetve *S. woodiana* egyed került. A szokásos 4 napos expozíciós időt követően a 6. és a 8. napon is vettem hemolimfa mintát. A vizsgálat előtt a felhasznált egyedeket lemértem (hosszúság, szélesség, vastagság, súly), és ez egyedi jelölés miatt ezek az értékek a mérés végén hozzáköthetőek az egyes egyedeknél tapasztalt MN számokhoz.

2.3.1.2. Benzapirén

A benzapirén ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}$) mutagén hatását először 1933-ban bizonyították. A benzapirén és metabolitjai jelenleg a legveszélyesebb mutagén és erősen karcinogén csoportba tartoznak az IARC (International Agency for Research on Cancer) szerint (Cogliano et al., 2011). A benzapirén kezelőszernek választását indokolja, hogy a Balatonba évente több mint 200 kg kerül belőle. Ez nagyrészt légköri lerakódásból származik, de a hajók üzemanyaga, hulladék maradványok és fa kezelőanyagok is szerepet játszanak benne (Baranyai et al., 1980; Bodnár et al., 2003). Mivel a Balaton sekélyvizű tó, a szél keltette hullámozás lazán tartja az üledék felső 10-15 cm-es rétegét, így kisebb mennyiségben szivárog mélyebbre. A Balaton PAH

szennyezése az öblökben koncentrálódik, itt átlagosan 330-530 µg PAH/kg üledék található, aminek kb. 7%-a benzapirén (Bodnár et al., 2004).

A vizsgálat egyik célja ebben az esetben is a rézszulfátnál már említett két kagylófaj érzékenységének összevetése volt, ugyanakkor a MN teszt eredményeit összevetettem két bakteriális teszttel, az Ames teszttel és az SOS Chromotest-tel. A benzapirén oldatot acetonitrillel készítettem, ami toxikus lehet a sejtek számára, ezért a benzapirénes kezelés során a kontrollon kívül szükség volt egy oldószeres kontrollra is. A vizsgálatot *U. pictorum* és *S. woodiana* egyedekkel is elvégeztem, a kontroll és az acetonitriles kontroll mellett 70 és 700 µgL⁻¹ koncentrációkkal (Eck-Varanka et al., 2014).

2.3.2. Környezeti minták vizsgálata

2.3.2.1. Allelopatikus növények és tannin

Az allelopátia általános meghatározás szerint valamilyen szerves vegyület kibocsátása növények vagy baktériumok által, ami hatással van más növényi vagy baktérium fajokra, így előnyt szereznek velük szemben a kompetícióban (Zou et al., 2015). Az allelopatikus növényeket tanulmányozó vizsgálatok során egyes összetevőket sikerült meghatározni, míg más vizsgálatokban, kísérletekben a bioaktív összetevő ismerete nélkül általában algakon tesztelték a toxikus hatást (Hilt & Gross., 2008). Mivel az allelopatikus hatású növényekben aktív összetevőként azonosítottak polifenolokat, azok közül is egyik leggyakoribbként a csersavat (tannint, C₇₆H₅₂O₄₆), ami nem csak a kompetícióban játszhat szerepet, de cito- és genotoxikus hatása is ismert (Chen et al., 2012b), így a mikronukleusz teszthez olyan növényeket választottunk, amik bizonyítottan csersav tartalmúak.

Annak érdekében, hogy a vizsgálat környezetileg is releváns legyen, a növények kiválasztásánál azt is figyelembe vettük, hogy előállhasson olyan valós helyzet, amelyben vízi környezetbe kerülhetnek az általuk kibocsátott bioaktív anyagok. Éppen ezért elsősorban vízi vagy vízközeli fajokat gyűjtöttünk, amelyek életük során a vízbe bocsátják ezeket az anyagokat, életük végén pedig anyagaik a lebomlásuk során juthatnak nagyobb mennyiségben is az élővizekbe, ahol a szűk környezetükben így magas koncentrációk is kialakulhatnak. Ezek mellett vizsgáltam két gyógynövényt is, amik teaként elkészítve és fogyasztva fejtik ki hatásukat az emberi szervezetre. Ilyen módon a gyógynövény koncentrációja a teában akár az 5 gL⁻¹-t is meghaladhatja.

Abból a célból, hogy a mikronukleusz számok alapján a növényeknél tapasztalt genotoxicitás okát a csersav tartalomra vezethessük vissza, szükség volt a tiszta csersav vizsgálata is. Ehhez analitikai tisztaságú tannin ($C_{76}H_{52}O_{46}$) vizes oldatával is elvégeztük a mikronukleusz tesztet. A felhasznált növények a következők voltak (10. ábra): érdes tócsagaz (*Ceratophyllum demersum* L. (*C. demersum*) (Ceratophyllaceae)), keskenylevelű gyékény (*Typha angustifolia* L. (*T. angustifolia*) (Typhaceae)), kolokán (*Stratiotes aloides* L. (*S. aloides*) (Butomaceae)), métegykóró (*Oenanthe aquatica* (L.) Poir. (*O. aquatica*) (Umbelliferae)), réti füzény (*Lythrum salicaria* L. (*L. salicaria*) (Lythraceae)), mocsári nőszirm (*Iris pseudacorus* L. (*I. pseudacorus*) (Iridaceae)) és cserszömörce (*Cotinus coggygria* Scop. (*C. coggygria*) (Anacardiaceae)). A cserszömörce a Pécselyi-medencéből, a többi növény a Kis-Balaton területéről került begyűjtésre.



10. ábra: A vizsgálatokhoz felhasznált allelopatikus növények

Minden növényből vizes extraktumot készítettünk 30 g szárított növény őrlemény és 500 ml desztillált víz felhasználásával, amelyet aztán 24 óráig szobahőmérsékleten rázattunk. Figyelembe véve, hogy a rendelkezésre álló kagylók száma korlátozott volt, valamint hogy a mérés elsődleges célja nem az adott növények toxikus hatásának felmérése volt, hanem a genotoxikus hatás és a csersav tartalom közötti összefüggés vizsgálata, így egyetlen koncentrációt állítottam csak be, egyedül a cserszömörce esetében volt egy 0,1 gL⁻¹-es koncentráció is. Előzetes vizsgálatok alapján ezt 1 gL⁻¹-nek választottam, amely már elég alacsony volt ahhoz, hogy a citotoxikus hatás elhanyagolható legyen, a genotoxikus hatás viszont szépen megmutatkozzon (Eck-Varanka et al., 2015; Eck-Varanka et al., 2016).

A vizsgálat során céлом volt a begyűjtött növények csersav tartalma okozta genotoxikus hatás meghatározása, így analitikai vizsgálatokkal minden növénynek megmértük az összes polifenol valamint a hidrolizált polifenol tartalmát. A polifenol tartalom mérése a Folin-Phenol módszer alapján a kiszárított levelekből történt. A hidrolizált polifenol méréséhez a vízmintákat és extraktumokat az Amerikai Közegészségügyi Egyesület (APHA American Public Health Association) ajánlása alapján hűtőben tároltuk és az extrakció után két héten belül lemértük (Rice & Bridgewater, 2012). A mintákat 4°C-on felolvasztottuk és 1 ml Folin reagenst, valamint karbonát-tartarát reagenst (Na₂CO₃ 1,88 molL⁻¹ és Na-tartrát dihidrát 0,052 molL⁻¹) adtunk hozzájuk, így a minták térfogata egyenként 50 ml lett. A 30 perc expozíciós idő letele után 700 nm-en mértük a minták abszorbanciáját, kalibrációhoz és standardnak 99%-os csersavat használtunk (Azrul et al. 2014).

A növények csersav tartalma alapján a vizsgálatához 15 μmolL⁻¹-es (25,5 mgL⁻¹) és 40 μmolL⁻¹-es (68 mgL⁻¹) koncentrációkat választottam. Mivel az előzetes vizsgálatok során az *U. pictorum* érzékenyebbnek bizonyult, mint a *S. woodiana*, a további vizsgálatokat már csak *U. pictorum* egyedeken végeztem el.

2.3.2.2. Szennyvíz

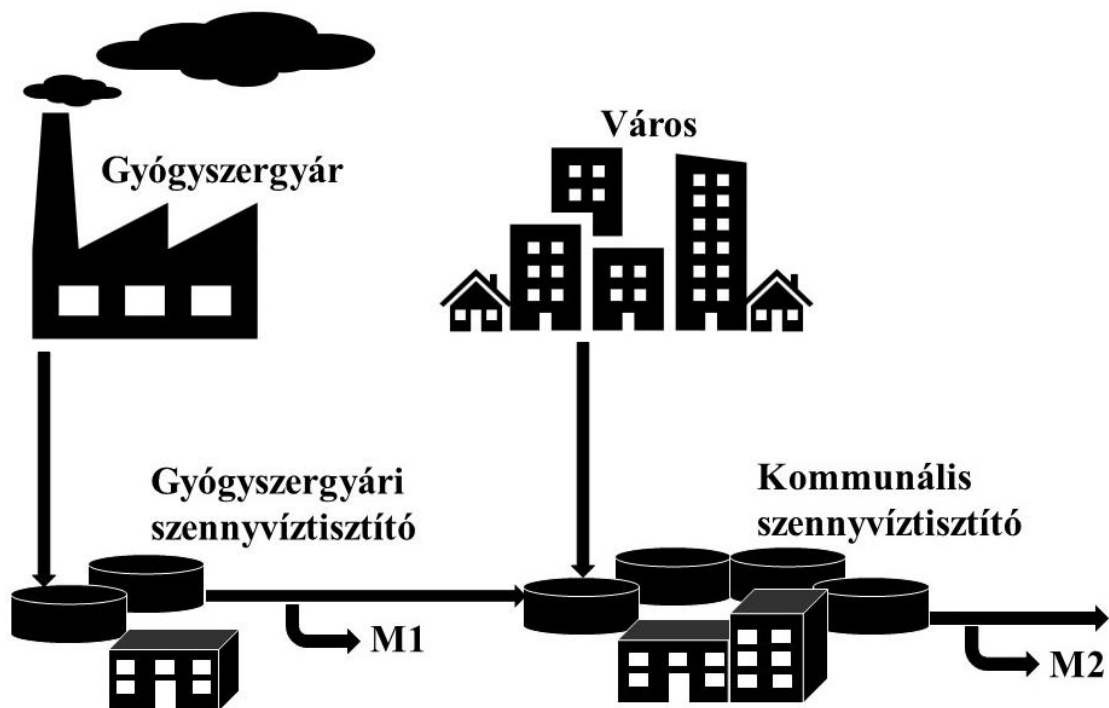
Kommunális szennyvizek genotoxikus hatásáért leggyakrabban gyógyszermaradékok és háztartási vegyszerek, valamint ezek metabolitjai felelősek (Kümmerer et al., 2000), de azokon a területeken, ahol a szennyvízgyűjtő rendszer egyben a csapadékvizeket is gyűjti a bemosódó PAH vegyületek is jelentős kockázatot jelenthetnek (White & Rasmussen, 1998).

Két különböző szennyvíz mintát is vizsgáltam a MN teszttel *U. pictorum* egyedeken, majd ezek eredményeit szabványos és ajánlott tesztekkel vettem össze (Eck-Varanka et al., 2016).

Az egyik minta Veszprém város előülepített nyers szennyvize, ami a BAKONYKARSZT Víz- és Csatornamű Zrt.-től származik. A mintavétel 2013. július 1-én történt, a MN tesztet

közvetlenül a mintavétel után megkezdtem, a maradék mintát a baktérium tesztek elvégzéséig -18°C -on tároltam. A MN teszthez a szennyvízből 10-szeres, 20-szoros, 30-szoros és 40-szeres hígításokat készítettem. Mivel a kommunális szennyvíz jelentős mennyiségű lebomló szerves anyagot tartalmaz, itt is szemistatikus módszert alkalmaztam és két nap után a víz felét lecseréltem és visszatöltöttem az eredeti koncentrációval. Ezt a szennyvíz mintát két bakteriális genotoxicitás teszttel is megvizsgáltam, melyek közül az egyik a fluktuációs Ames teszt, a másik pedig a környezetvédelmi és vízügyi miniszter 27/2005. (XII. 6.) KvVM rendeletében ajánlott SOS Chromotest.

A másik szennyvíz mérés mintái egy olyan magyarországi szennyvíztisztítóból származtak, amelybe előkezelt gyógyszergyári szennyvizet is bevezetnek. Itt két mintát vizsgáltam, az egyik (M1) az előkezelt gyógyszergyári szennyvízből származik, mielőtt hozzákevernék a nyers kommunális szennyvízhez, a másik minta (M2) a szennyvíztisztító elfolyójából lett gyűjtve (11. ábra).



11. ábra: A gyógyszergyári szennyvíz minták mintavételi helyeinek ábrája

A MN tesztet a mintavétel napján kezdtem, a maradék mintát -18°C -on tároltam későbbi felhasználásra. A MN teszt eredményeit egy spermium alapú flow citometriás méréssel vettem össze, amely a DNS károsodás mellett citotoxikus hatást is kimutat (Kakasi et al., 2016).

A gyógyszergyári szennyvizek kétszeresen is problémát okozhatnak. Egyrészt, ha megfelelő előkezelés nélkül vezetik egy biológiai szennyvíztisztítóba, akkor a benne lévő vegyi anyagok könnyen lemérgezik a szennyvíztisztító baktériumközösséget, így nem megfelelően kezelt szennyvíz fog távozni az elfolyón. Másrészt, a gyógyszermaradványok a környezetbe kerülve közvetlenül is károsítják az érintett élőhelyet (Larsson et al., 2007). A kémiai analízis komplex szennyvíz minták esetében nem mindig mutatja ki annak valós ökotoxikus hatását, ezért ennek kiegészítéseként szükség van ökotoxicitás tesztek elvégzésére, amelyek lehetőleg több trofikus szintet is átfognak (Mendonça et al., 2009).

2.3.2.3. Biodízel

A környezetszennyezés csökkentése érdekében az elmúlt években egyre jobban elterjedt a különböző bioüzemanyagok használata. A tudományos szakirodalomban is nagy hangsúlyt kapott ezek előállításának, felhasználásának és teljes életciklusának vizsgálata a hagyományos üzemanyagokkal összehasonlítva (Yang 2013; Steiner et al., 2013). Az elégetés nélkül (például valamilyen havária, baleset következtében) környezetbe kerülő bioüzemanyagok ökológiai hatásainak elemzésével viszonylag kevés írás foglalkozik (Lapinskiene et al., 2006).

Az általam vizsgált minta egy repce alapú biodízel volt, melyet a Rossi Biofuel Zrt. (Magyarország, Komárom) szolgáltatott. A biztonsági adatlap szerint a biodízel 99,7% FAME (zsírsav metilészter) és 0,3% metanol tartalmú, semleges pH-jú a sűrűsége pedig 0,875-0,9 g/cm³.

A biodízel minta genotoxikus hatását kagyló MN teszttel és Flow citometriás méréssel vizsgáltam, hogy minél átfogóbb képet kapjunk a toxikus jellegéről. Mivel a célom az volt, hogy feltérképezsem a környezetbe, élővízbe került nyers biodízel genotoxikus hatásait, így a mintát ennek megfelelően készítettem elő a tesztekhez. Először 1:1 arányban vízzel kevertem a biodízelt, majd ezt az elegyet 130 rpm fordulatszámon, 24 óráig szobahőmérsékleten rázattam. Ezután 30 percig hagytam pihenni és elválasztottam egymástól a vizes és olajos fázist. A vizsgálatokhoz a vizes fázisból készítettem a hígítási sort. Az el nem égetett biodízel toxicitását vizsgáló szakirodalomban 1-12% közötti biodízel koncentrációt alkalmaztak, amit előzetes kísérletek alapján a talaj biodízellel való telítettsége alapján választottak (Lapinskiene et al., 2006). Mivel vízi környezetbe került biodízel minta toxicitásának vizsgálatáról még nincsen szakirodalmi forrás, én is az előbb említettekhez hasonlóan választottam meg a biodízel koncentrációkat, így a MN teszt során 10-szeres, 20-szoros, 30-szoros és 40-szeres hígításokat vizsgáltam *U. pictorum* egyedeken (Eck-Varanka et al., 2018).

2.3.3. *In situ* vizsgálatok

Az *in situ* kísérletre az MTA Ökológiai Kutatóközpont és Balatoni Limnológiai Intézet kikötőjében (továbbiakban: Limnológia), valamint a Tihany rév kikötőjében (továbbiakban: Rév) került sor 2014 októberében (12. ábra). Mivel a *S. woodiana* hazánkban invazív és élővízbe való kihelyezése könnyen vezethet mesterséges terjesztéséhez, ezért az *in situ* vizsgálatot csak a Balatonból gyűjtött *U. pictorum* egyedekkel végeztem. A mérés célja nem a két vizsgálat hely szennyezettségének felmérése volt, hanem a kagyló MN teszt *in situ* jellegű alkalmazásának felmérése, a lehetséges problémák feltárása és az eredményt befolyásoló tényezők meghatározása volt, így nem készítettem külön kontrollt.



12. ábra: Az *In situ* mérés két helyszíne: az MTA ÖK BLI és Tihany rév

Míg maga a mikronukleusz teszt jól rögzített és validált protokoll alapján elvégezhető, a kihelyezett kagylókat alkalmazó *in situ* vizsgálatok során meglehetősen eltér az egyes szerzők által alkalmazott expozíciós idő, továbbá a párhuzamosok (egy minta értékelésekor alkalmazott kagylók) száma. Guidi et al. a Possera és Cecina folyók szennyezettségének feltérképezésére *U. pictorum* egyedeket használtak (55-75 mm mérettartományban), amelyeket a Maggiore-tóból gyűjtöttek. Gyűjtés után a kagylókat közvetlenül felhasználták (akklimatizáció nélkül),

az egyes pontokra 15-15 kagylót helyeztek ki, 4 hetes expozíciós idővel (a vizsgálat időpontja március volt) (Guidi et al., 2010). Egy másik tanulmányban szintén *U. pictorum*-ot alkalmazott (mérettartomány 60-78 mm), 3 hetes expozíciós idővel, mintavételi pontonként 30 egyed kihelyezésével (októberi expozícióval) (Štambuk et al., 2009). Vuković-Gaćić et al. *U. pictorum* és *U. tumidus* kagylókat alkalmaztak (mérettartomány 70-100 mm). Vizsgálatukban a begyűjtött egyedeket 10 napos akklimatizáció után helyezték ki, mintavételi pontonként 40 egyedet, 30 napos expozícióval. A vizsgálatot április 14 és május 15 között végezték (Vuković-Gaćić et al., 2014).

Mindezek figyelembevételével 1 hónapos expozíciós időt alkalmazva, mindkét helyre 3-3 hálós zsákban telepítettünk ki zsákonként 10-10 db kagylót, amelyekből a kihelyezéstől számított 7., 14. és 28. napon vettem mintát.

3. Eredmények és kiértékelésük

3.1. Egykomponensű minták vizsgálata

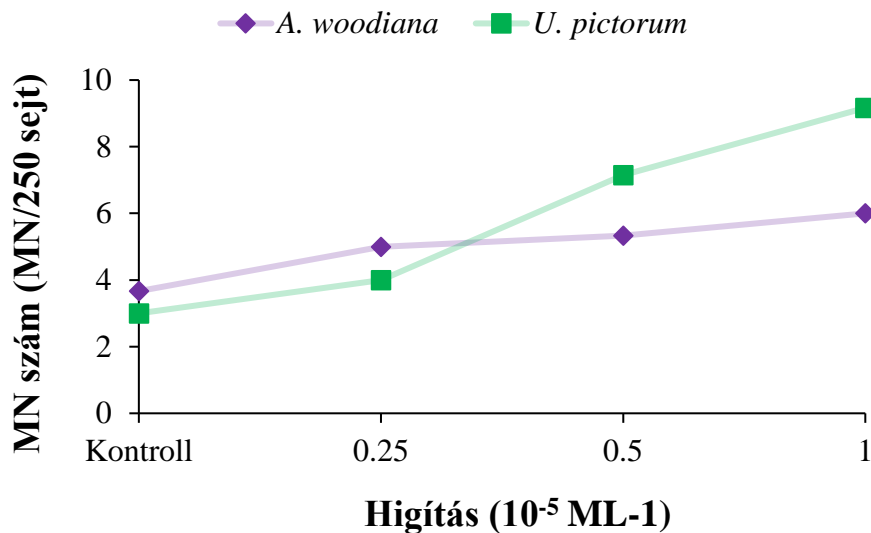
A bevezető méréseket már ismert genotoxikus hatású szennyezőanyagokra terveztem, hogy a teszt eredményét befolyásolható faktorok hatását, illetve különböző tesztek egymáshoz viszonyított érzékenységet kivizsgáljam. További céloom az volt, hogy az optimális expozíciós időt meghatározzam.

3.1.1. Rézszulfát

3.1.1.1. *U. pictorum* vs. *S. woodiana*

A kísérlet 4. napjára a legtöményebb koncentrációban ($10 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$) az összes *U. pictorum* egyed elpusztult, így genotoxicitás tekintetében ezt a koncentrációt nem tudtam vizsgálni. A rézszulfát kezelés csak az *U. pictorum* esetében volt szignifikáns ($p=0,0029$, $F=11,36$, $df=3$), itt csak a legkisebb koncentrációra kapott MN számok nem különböztek jelentősen a kontrolltól ($K0,25 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$: $p=0,525$, $K0,5 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$: $p=0,0121$, $K1 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$: $0,0041$). A *S. woodiana* egyedek kisebb érzékenységet mutattak ($p=0,3715$, $F=1,1954$, $df=3$), egyik koncentráció hatása sem volt szignifikáns ($K0,25 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$: $p=0,7266$, $K0,5 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$: $p=0,5804$, $K1 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$: $p=0,3240$). A kétutas faktoriális ANOVA során a független változók a koncentrációk és a két faj volt, a függő változó pedig a mikronukleusz szám változás. A statisztikai elemzés alapján a MN számra a koncentrációnak van főhatása ($p<0,0001$, $F=24,7521$, $df=1$), míg a faj hatása

önmagában nem szignifikáns ($p=0,0733$, $F=3,5729$, $df=1$), a faj-koncentráció interakció pedig szintén szignifikáns hatással bír ($p=0,0252$, $f=5,8521$, $df=1$). A két faj koncentráció-válasz görbéit a 13. ábra szemlélteti.

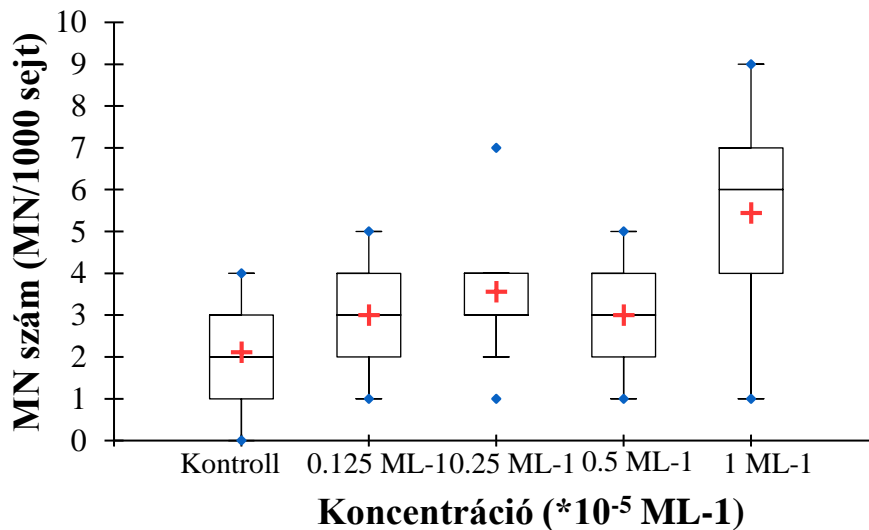


13. ábra: A rézszulfát kezelésre kapott MN számok az *U. pictorum* és a *S. woodiana* egyedek hemolimfájában

A két kagylófaj érzékenységében a rézszulfátra nem volt szignifikáns eltérés, ugyanakkor a *S. woodiana* hemolimfájában tapasztalt MN számok a magasabb koncentrációkban láthatóan alacsonyabbak voltak. A legmagasabb koncentrációban az *U. pictorum* jelentősen nagyobb érzékenységet mutatott a rézszulfát citotoxikus hatására, mint a *S. woodiana*, amelyekből csupán egy pusztult el. A MN számokat tekintve is megfigyelhetjük, hogy az *U. pictorum* bizonyult érzékenyebbnek a rézszulfát kezelésre. Feltételezhetően a bizonyos szennyezőkre mutatott, az őshonos fajokéhoz képest nagyobb ellenállóképessége is hozzájárulhat sikeres inváziójához (Ponta et al., 2002). Bár az *U. pictorum* gyűjtését és használatát bizonyos mértékig korlátozza az új halászati törvény (2013. évi CII. törvény a halgazdálkodásról és a hal védelméről), amely az őshonos fajok – beleértve a kagylókat is – védelmére külön hangsúlyt fektet, míg az invazív fajok gyűjtését és használatát nem korlátozza, a környezetileg relevánsabb eredmények érdekében a tesztekét érdemesebb az érzékenyebb fajjal végezni, mint az ellenállóbbal.

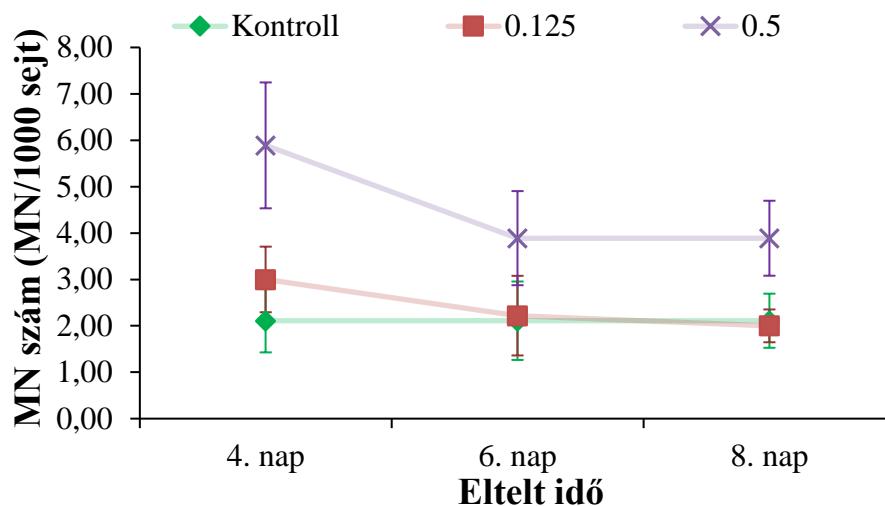
3.1.1.2. Időfüggés vizsgálat

A mérés során az *Unio pictorum* egyedekből 4, 6 illetve 8 nap elteltével vettem hemolimfa mintát. A teljes koncentrációsort csak a 4. napon mértem végig, a továbbiakhoz a kontroll mellett csupán $0,125 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ és $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ -es koncentrációkat használtam. A kapott eredményeket a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra: A rézsulfát kezelésre a 4. napon mért MN számok a koncentráció függvényében

A 4. napi mérések alapján még szépen kirajzolódó görbe a 6. és 8. napon vett minták esetében már kisebb eltéréseket mutat (15. ábra). A kontrollban tapasztalt MN szám a teljes kísérlet alatt közel állandó szinten maradt. A $0,125 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ -es koncentrációra adott válasz 6 nap elteltével visszacsökkent a kontroll szintjére, míg a $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ -es koncentráció esetében bár szintén jelentősen csökkent a MN szám, de még így is szignifikáns eltérést mutatott a kontrollhoz képest. Megállapíthatjuk, hogy a 4 napos expozíció leteltével hirtelen lecsökken a MN szám, majd egy lassabb ütemű visszaesés következik.



15. ábra: A MN szám változása az idő függvényében a kontroll valamint a $0,125 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ és a $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ rézszulfát koncentráció hatására

A vizsgálat eredménye megegyezik a Woznicki et al. által tapasztaltakkal, akik *S. woodiana* egyedeken vizsgálták a benzapirén okozta DNS károsodás mértékét MN teszttel és Comet teszttel 4 és 7 nap kezelést követően (Woznicki et al., 2004). Egy másik tanulmány szintén azt mutatta ki, hogy benzapirénnel kezelt kagylókon mért DNS károsodás (Comet teszt) a folyamatos szennyezés ellenére a 14. naphra a kontroll szintjére csökkent vissza. Ennek a két tanulmánynak az eredményei arra utalnak, hogy a kagylók képesek olyan adaptív választ adni magas benzapirén szennyezés esetén, amely megakadályozhatja a folyamatos DNS károsodást (Large et al., 2002). Az általam végzett vizsgálatban a kapott eredmények ugyanolyan adaptív válasz kialakulására engednek következtetni a rézszulfát esetében is. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy az ezen adaptációért felelős mechanizmusok egyelőre nem ismertek.

3.1.1.3. Méretfüggés vizsgálat

Annak érdekében, hogy a koncentráció ne legyen hatótényező, a statisztikai vizsgálatot csak az $1 \cdot 10^{-5} \text{ ML}^{-1}$ rézszulfát koncentrációval végeztem el a 4. napon kapott értékekkel, mivel ebben az esetben volt a legmagasabb a tapasztalt MN szám. A regresszió analízisre kapott adatokat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A rézszulfát kezelés méretfüggés vizsgálatára kapott statisztikai adatok

Faktor	R ²	F érték	df	p érték
Hosszúság	0,1365	1,106	7	0,3278
Szélesség	0,0955	0,7393	7	0,4184
Vastagság	0,3377	3,569	7	0,1008
Súly	0,2229	2,008	7	0,1994
Összes	0,4089	0,6917	4	0,6351

A statisztikai vizsgálatra kapott adatokból megállapítható, hogy a méretbeli különbségek nem okoznak szignifikáns eltérést a keletkező MN-ok számában.

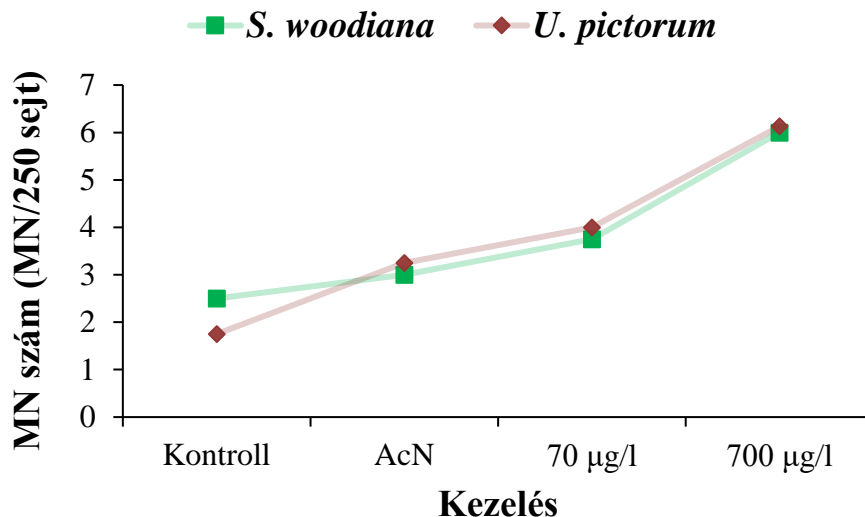
Több szakirodalmi példa is kimutatta, hogy a felhasznált egyedek mérete befolyásoló faktor lehet a MN teszt során. A kisebb méretű vagy fiatalabb egyedek mutatnak nagyobb érzékenységet a szennyezőkre, azonban ezeknél a vizsgálatoknál a kagylók mérete közötti különbségek nagyobbak voltak, mint az általam vizsgált egyedek esetében (Mubiana et al., 2006; Swaileh & Adelung, 1994). Bizonyos szennyezőkre viszont éppen a felnőtt egyedek érzékenyebbek (Swaileh & Adelung, 1994). Mivel adott vizsgálatnál általában hasonló méretű kagylókat használnak, az ebből adódó különbségek elhanyagolhatóak, azonban a más vizsgálatokkal való összehasonlításnál már érdemes figyelembe venni.

3.1.2. Benzapirén

3.1.2.1. *U. pictorum* vs. *S. woodiana*

A rézszulfáthoz hasonlóan itt is előbb egyutas ANOVA, majd Tukey post hoc módszerrel történt az eredmények értékelése, végül a két faj érzékenységének összehasonlítását kétutas faktoriális ANOVA-val végeztem. A kezelésre adott válasz ebben az esetben mindkét fajnál szignifikáns eredményt adott (*S. woodiana*: $p=0,0075$, $F=6,4648$, $df=3$; *U. pictorum*: $p<0,0001$, $F=16,0932$, $df=3$). Az acetonitril kontrollnál (AcN) ugyan emelkedett a MN szám, de a változás egyik faj esetében sem volt szignifikáns (*S. woodiana*: $p=0,9357$, *U. pictorum*: $p=0,1010$).

A Tukey elemzés eredménye az *U. pictorum* egyedeknél a kontroll csoporthoz képest mind a $700 \mu\text{gL}^{-1}$ -es mind a $70 \mu\text{gL}^{-1}$ -es koncentráció esetében szignifikáns volt (rendre $p<0,0001$ és $p=0,0063$), míg a *S. woodiana* egyedeknél csupán a $700 \mu\text{gL}^{-1}$ -es koncentráció mutatott szignifikáns eltérést ($p=0,007$). A mért MN számok a két vizsgált faj esetében a 16. ábrán láthatóak.



16. ábra: A benzapirén kezelésre kapott MN számok az *U. pictorum* és a *S. woodiana* egyedekre

A *S. woodiana* és *U. pictorum* egyedek MN számait a koncentráció és a faj függvényében kétutas faktoriális ANOVA-val értékelve a rézszulfáthoz hasonlóan csak a koncentrációra adott szignifikáns eltérést ($p < 0,0001$, $F = 36,421$, $df = 1$), míg a két faj érzékenysége közötti eltérés ($p = 0,8673$, $F = 0,0286$, $df = 1$), valamint a faj-koncentráció interakció hatása ($p = 0,2779$, $F = 1,2443$, $df = 1$) nem szignifikáns.

A benzapirénes kezelés nem mutatott a két vizsgált faj érzékenysége között olyan mértékű eltérést, mint a rézszulfát hatására, ugyanakkor a *S. woodiana* csak a magasabb, $700 \mu\text{gL}^{-1}$ -es koncentrációnál adott a kontrolltól szignifikánsan eltérő MN számot, míg az *U. pictorum* egyedekre már a $70 \mu\text{gL}^{-1}$ -es koncentráció is genotoxikusnak hatott. Bár a két koncentráció-válasz görbe lefutása nagyon hasonló, a statisztika alapján a benzapirén esetében is az őshonos kagylófaj reagált érzékenyebben, így ennek a szennyezőnek az esetében is az *U. pictorum* ajánlható tesztszervezetnek.

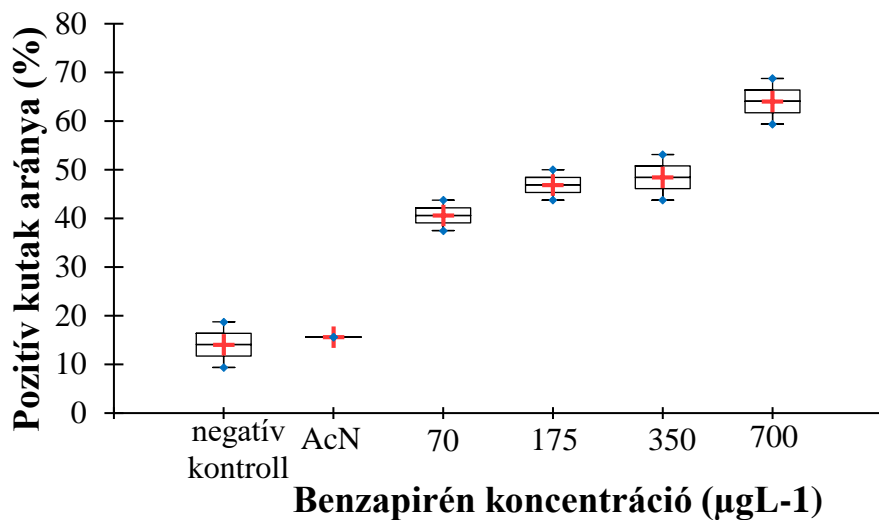
3.1.2.2. MN teszt vs. bakteriális tesztek

A különböző benzapirén koncentrációkon végzett Ames teszt eredményeit a 2. táblázat foglalja össze, amely a két párhuzamos kísérletekben kapott pozitív válaszok átlagát, szórását és a khinégzet-próba értékét tartalmazza. Szignifikánsnak szintén az $\chi^2 < 0,05$ eredményeket tekintetem, ezek mutagén hatásának minősülnek

2. táblázat: A benzapirénen végzett Ames teszt eredményei

	negatív kontroll	AcN	70 μgL^{-1}	175 μgL^{-1}	350 μgL^{-1}	700 μgL^{-1}
Átlag	4,5 \pm 2,121	5,0 \pm 0	13,0 \pm 1,414	15,0 \pm 1,414	15,5 \pm 2,121	20,5 \pm 2,121
χ^2		0,86046	0,01714	,0.00435	0,00301	0,00004

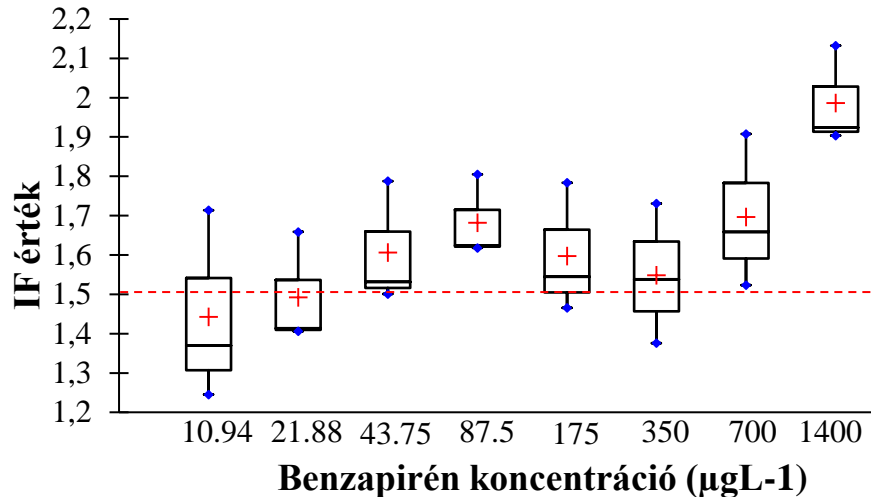
A 17. ábrán az Ames teszt különböző benzapirén koncentrációkra adott pozitív válaszainak átlaga és szórása van feltüntetve.



17. ábra: Az Ames teszt során benzapirénre kapott pozitív válaszok átlaga és szórása

Az eredményekből látható, hogy az acetonitrilre a χ^2 próba nem szignifikáns, vagyis az oldószer nem mutatott mutagén jelleget. Ellenben a benzapirén már a legkisebb koncentrációban szignifikáns eltérést mutat, ami a koncentráció növekedésével erősödik.

A benzapirén genotoxikus hatását 1400 μgL^{-1} és 10,93 μgL^{-1} -es koncentráció között vizsgáltam SOS Chromotest-tel, S9 aktivációval és nélküle is. A kapott eredményeket a 18. ábrán mutatom be.



18. ábra: Az SOS Chromotest-tel benzapirénre kapott SOS Indukciós Faktor értéke S9 aktivációval

A benzapirén kezelés hatására az S9 indukció esetén az IF már a 43,75 µgL⁻¹-es koncentráció esetén eléri a 1,5-ös küszöbértéket. Az S9 aktiválás nélkül a benzapirén az SOS Chromotest-tel egyik koncentrációban sem mutatkozott genotoxikusnak.

Számos példát találunk arra, hogy környezeti olajszennyezés mutatnak ki kagyló mikronukleusz teszttel (Banni et al., 2010; Bolognesi et al. 2006.). Policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) öko- illetve genotoxicitásának tesztelésére a kagylók több szempontból is releváns és reprezentatív tesztszervezetként alkalmazhatók. Banni et al. (2010) *Mytilus galloprovincialis* egyedeken alkalmaztak mikronukleusz tesztet benzapirén akut genotoxikus hatásának minősítésére. Vizsgálatukban a PAH csoport genotoxikus hatása már 24 órás expozíciós idő után megmutatkozott.

Mivel a felnőtt kagylók üledéklakó, szesszilis szervezetek, a környezetben leggyakrabban tapasztalható expozíciós utat is megbízhatóan reprezentálják, hiszen az édesvízi (de akár tengeri) ökoszisztémákba került PAH-ok, alacsony oldhatóságuk miatt, az üledékben akkumulálódnak. Bioakkumulációs kísérletek során kimutatták, hogy a kagylók gyorsan, néhány óra alatt képesek a környezetükből PAH-ok felvételére, míg a kiürülés lényegesen lassabb ütemű (D'Adamo et al., 1997).

Az Ames teszt eredményei egyértelműen alátámasztják a benzapirén genotoxikus hatását már alacsony koncentrációban is. S9 aktiváció mellett a 70 µgL⁻¹-es koncentráció már mutagén hatású, és a magasabb koncentrációk arányosan növekvő mutagenikus hatást eredményeznek. A nagyobb koncentrációjú szennyező anyagokat tartalmazó minták vizsgálata esetében az Ames tesztnél hátrány lehet, hogy a citotoxikus koncentrációban jelen lévő – egyébként

mutagén anyagok – negatív eredményt adhatnak a sejtnövekedés gátlása miatt a tesztben. Ez körültekintő kísérleti tervezéssel, és megfelelő hígítási sorok alkalmazásával ugyan kiküszöbölhető, de főleg nehézfémekkel szennyezett minták vizsgálatánál az oligodinamikus hatás miatt gondot jelenthet. A környezeti minták tesztelésénél a mintában jelen lévő egyéb mikroorganizmusok (a teszttenyészetén kívül), illetve az ezekből adódó kontaminációk szükségessé tehetik egyéb kiegészítő lépések, antibiotikumok, pl. ampicillin hozzáadását, illetve mikroszűrők alkalmazását. Az SOS Chromotest érzékenysége több szennyező esetén is elmarad az Ames teszt, vagy akár a MN teszt érzékenységétől, mivel vannak olyan mutagén vegyületek, amik nem indukálnak SOS választ pl. a benzidin, ciklofoszfamid vagy az etidiumbromid (Quillardet & Hofnung, 1993). A benzapirénes kezelés azonban mindhárom tesztnél elég hasonló eredményeket adott, igaz, a két bakteriális teszt csak S9 aktivációval mutatott ki genotoxikus hatást.

A kagyló MN teszt bakteriális tesztekkel való összehasonlítására kevés szakirodalmi példa található, bár kételtű MN tesztre létezik néhány összehasonlító tanulmány. A dél-afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*, Daudin, 1802) embriókat használó szabványosított MN tesztet nemzetközi és nemzeti protokollok is ajánlják, pl. az AFNOR NFT 90-325 módszer (AFNOR 2000). Egy PAH vegyületekkel szennyezett talajmintán végzett vizsgálat a kételtű MN tesztet, az Ames tesztet valamint egy másik bakteriális tesztet, a Mutatox tesztet alkalmazta. Ennek során a MN teszt ki tudott mutatni genotoxikus hatást, míg az Ames teszt eredménye negatív lett és a Mutatox teszt is csak közepes érzékenységgel bírt (Mouchet et al., 2006). Szintén a MN teszt bizonyult a legérzékenyebbnek egy összehasonlító tanulmányban, amely során 7 szennyezőanyag, köztük a benzapirén hatását vizsgálták. A MN teszt mellett szintén az Ames és az SOS Chromotest módszert alkalmazták; a két bakteriális teszt érzékenysége itt közel azonos volt, de a MN tesztnél alacsonyabb (Le Curieux et al., 1993).

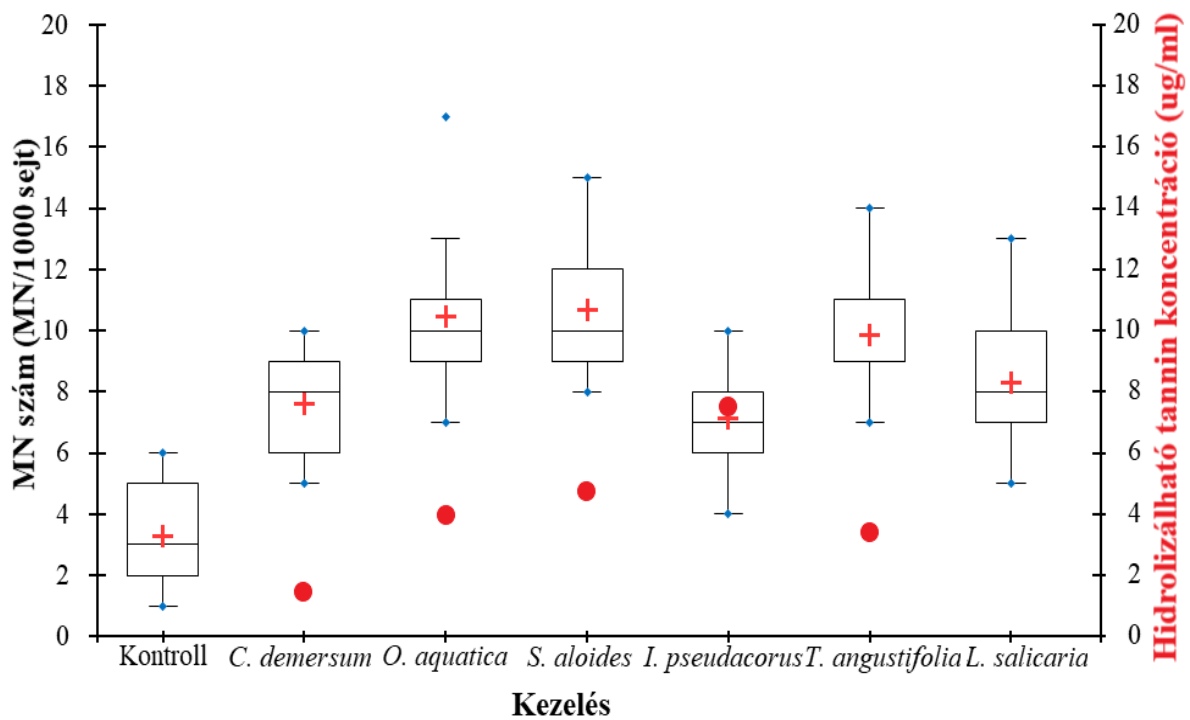
Az általam végzett vizsgálatban mindhárom teszt pozitív genotoxikus választ adott, de a koncentráció-válasz görbéket megfigyelve láthatóak a különbségek. A bakteriális tesztek csak az S9 aktivációval adtak pozitív választ, így megállapítható, hogy a benzapirénnek a lebomlása során keletkező metabolitjai rendelkeznek genotoxikus karakterrel. A görbék lefutását tekintve csak a MN teszt és az Ames teszt mutatott ideális koncentráció-válasz kapcsolatot, vagyis a válasz erőssége a koncentráció függvényében azzal együtt növekedett. Az SOS Chromotest eredményei nem mutattak ilyen következetességet. Szintén a MN teszt javára írható, hogy az acetónitril kontroll nem szignifikánsan ugyan, de MN szám növekedést okozott, míg az Ames teszt a két kontrollt egyformának mutatta. Az Ames teszt és a MN teszt koncentráció-válasz

görbéinek hasonló lefutása arra enged következtetni, hogy a benzapirén egyszerre okoz kromoszóma mutációt és pontmutációt is.

3.2. Környezeti minták vizsgálata

3.2.1. Allelopatikus növények és tannin

A növényi kivonatokkal kagylókon végzett mikronukleusz teszt eredményeit az analitikai vizsgálatokkal meghatározott tannin tartalmukkal is össze lehet hasonlítani. A 19. ábrán a két vizsgálat eredményei párhuzamosan láthatók, így könnyen összevethetők, míg a pontos értékeket a 3. táblázat mutatja.



19. ábra: A vizsgált növények genotoxikus hatása mikronukleusz teszttel és a növények hidrolizált tannin tartalma (a *L. salicaria* esetében a hidrolizált tannin értéke kiugróan magas volt, amely eltorzította volna az ábrát, ezért ez az érték csak a táblázatban szerepel)

3. táblázat: A vizsgált növényekre mért tannin tartalmak, MN számok és a kontrolltól való eltérés p értékei

Minta	Összes tannin (mg/g)	Hidrolizált tannin (µg/ml)	MN szám (MN/1000 sejt)	Kontrolltól való eltérés p értéke
Kontroll (Balaton)	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt	3,26 ± 0,18 (2,11 ± 2,76)	
<i>C. demersum</i>	0,07 ± 0,01	1,52 ± 0,03	7,65 ± 0,29	4,37*10 ⁻⁶
<i>O. aquatica</i>	0,20 ± 0,02	3,99 ± 1,89	10,47 ± 1,24	1,97*10 ⁻¹⁰
<i>S. aloides</i>	0,20 ± 0,02	4,54 ± 1,40	10,83 ± 1,38	7,87*10 ⁻¹¹
<i>T. angustifolia</i>	0,08 ± 0,00	3,42 ± 0,14	9,70 ± 1,05	1,98*10 ⁻⁹
<i>I. pseudacorus</i>	0,17 ± 0,01	7,14 ± 0,06	7,11 ± 1,83	1,27*10 ⁻⁴
<i>L. salicaria</i>	0,20 ± 0,07	66,49 ± 0,90	8,00 ± 2,29	3,04*10 ⁻⁷

A Balatonban a hidrolizált tannin koncentrációja kimutatási határ alatt van. Az elvégzett statisztikai vizsgálatok alapján elmondható, hogy az 1 gL⁻¹-es hígítás mindegyik extraktumból szignifikáns eltérést mutatott a kontrolltól, azonban a hidrolizált tannin koncentrációval nem volt egyértelmű összefüggés. A kiugró pontokat ebben az esetben az *Iris pseudacorus* és a *Lythrum salicaria* jelentette, amelyeknél a tapasztalt genotoxikus hatás mértéke nem korrelált azok hidrolizált tannin tartalmával. Az írisznél az átlagosnál kicsit magasabb hidrolizált tannin koncentráció nem indukált magasabb MN számot – valójában ennél tapasztaltam a legalacsonyabbat – míg a fűzénynél az átlagos MN szám mellett rendkívül magas volt a hidrolizált tannin koncentrációja.

Egy összehasonlító tanulmányban Hilt és Gross (2008) a vízi növényeket három csoportba sorolta allelopatikus potenciáljuk alapján. A *C. demersum* ezek közül a legerősebb hatású csoportba tartozik, míg a *S. aloides* a közepesbe, a harmadik csoportba azokat a növényeket sorolták, amelyek allelopatikus potenciálja alacsony, vagy egyáltalán nincs. Az általam végzett vizsgálatok azonban éppen fordított hatást mutattak ki a két növény esetében. Ennek magyarázata a hatóanyagoknak az eltérő testszervezetekre kifejtett hatásának különbözőségében lehet, mivel Hilt & Gross fitoplanktonon végezték a vizsgálatot, míg én kagylókon). Az allelopátiáért felelős vegyületek – mint a tanninok és fenolok – expozíciós útvonala még kevésbé ismert. A laboratóriumi vizsgálatok általában nem foglalkoznak azzal, hogy ezeket az összetevőket hogyan bocsátják ki a növények. A legvalószínűbb, hogy a tanninok és fenolok nagy része az elhalt növények lebomlása során szivárog ki a környezetükbe.

Íly módon egy növény ökológiai kockázatának meghatározásakor a lebomlás fázisát is figyelembe kell venni (Chen et al., 2012b). Ugyanakkor az allelopátiának akkor van értelme, ha a növények képesek a vegetációs periódusuk alatt kibocsátani ezeket az anyagokat, amit mezokozmosz tesztekkel meg is erősítettek (Juan et al., 2014; Švanys et al., 2014; Vanderstukken et al., 2014).

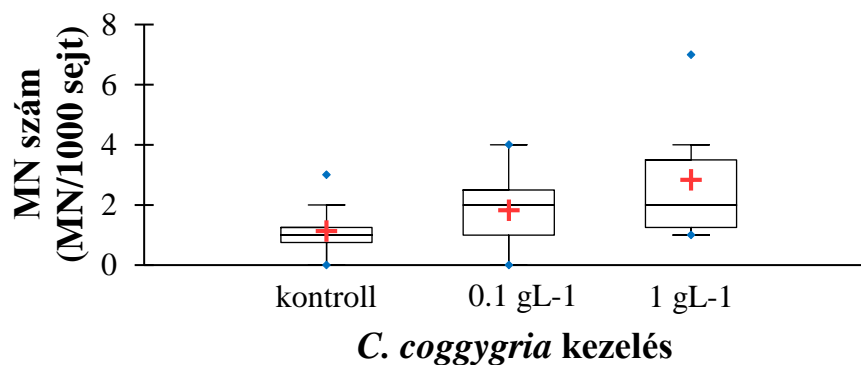
Bár egyes tanulmányok a tanninokon és polifenolokon kívül más komponenseket is felelőssé tesznek az allelopatikus hatásért (Xian et al., 2006; Le Thi et al., 2014), az általam végzett vizsgálatok több növény esetében is (a füzény és az írisz kivételével) egyértelmű korrelációt mutattak az összes tannin tartalom ($R=0,900$, $p=0,05$) és a MN szám között, valamint a hidrolizált tannin és a MN szám között is ($R=0,975$, $p=0,01$). Az eredmények szépen mutatják, hogy a vizsgált növények jelentős bioaktív és genotoxikus potenciállal rendelkeznek. A szignifikáns korreláció a tannin (az összes és a hidrolizált esetében is) és a MN szám között pedig megerősíti, hogy a genotoxikus hatásért felelős komponensek között a tanninnak jelentős szerepe van.

Mivel a kísérleteim során a növények vizes kivonatával dolgoztam – így a természeteshez hasonló expozíciós útvonalakat biztosítva – feltételezhető, hogy ezeknek a növényeknek a genotoxikus potenciálja valós ökológiai kockázatot jelenthet a környezetükben lévő élőlényekre, amely növények öregedése és lebomlása során lehet még jelentősebb. A pontos expozíciós útvonalak és a kibocsátás körülményeinek feltérésére azonban további vizsgálatokra lenne szükség.

A vizsgált vízi növények közül kiemelném a füzényt, mivel ez ismert gyógynövény, így az ebből készített tea hatása közvetlenül érinti az embert. Az egyértelmű következtetések levonását nehezíti, hogy az eddigi tanulmányok alapján a tanninok biológiai hatása vízi környezetben nem egységes. Alacsony koncentrációban ($1-5 \mu\text{molL}^{-1}$) a tanninok antioxidáns hatást fejthetnek ki és jelentősen csökkenthetik a H_2O_2 okozta károsodások mértékét (Labieniec et al., 2003). A nagyobb koncentráció ugyanakkor egyes DNS szál töréseket válthat ki, amit *U. tumidus* egyedeken is megfigyeltek (Labieniec & Gabryelak, 2007). Chukwujekwu és Van Staden kimutatta a füzény mutagén karakterét *Distephanus angulifolius*-on az *Allium cepa* bioteszt segítségével. A genotoxikus hatás kimutathatóan koncentráció függő volt egészen $5,3 \text{ gL}^{-1}$ -ig, ennél nagyobb töménységben citotoxikus hatás lépett fel (Chukwujekwu & Van Staden, 2014). 50 afrikai gyógynövény emberi fehérvérsejteken végzett vizsgálata során a $0,1-2,5 \text{ gL}^{-1}$ koncentráció tartományban a nagyrészüknél genotoxikus hatást mutatott ki a MN teszt. A füzény esetében az 1 gL^{-1} -es koncentrációnál tapasztalt mutagén hatás összhangban van az általam végzett vizsgálatok eredményével is (Fennel et al., 2004). A füzény levelekből készített

főzet gyógyászati alkalmazása során nem lehet figyelmen kívül hagyni annak potenciálisan genotoxikus hatását.

A másik gyógynövény, amelyet a hagyományos gyógyászatban is alkalmaznak és szintén rendelkezik potenciális genotoxikus hatással az a cserszömörce, ami az előzőektől eltérően szárazföldi növény. A cserszömörécét a kifejezetten magas csersav tartalma miatt választottam, amiről a nevét is kapta. A mért összes tannin tartalom 150,03 mg/g volt – ami jelentősen magasabb a vizsgált vízi növények tannin tartalmánál – míg a hidrolizált tannin mennyisége a fűzényhez hasonlóan 66,35 µg/ml volt. A MN teszt alapján a cserszömörce nem mutatott szignifikáns MN indukciót, a MN szám a kontroll esetében 2,1, a 0,1 gL⁻¹-es koncentrációnál 1,8, míg az 1 gL⁻¹-nél 3,3 MN/1000 sejt volt (Welch-ANOVA: df=2, F=1,3424, p=0,2787, t-test: p=0,8655 a kontroll és az 0,1 gL⁻¹ között, p=0,112 a kontroll és az 1 gL⁻¹ között valamint p=0,0697 a 0,1 gL⁻¹ és az 1 gL⁻¹ koncentráció között). A MN teszt eredményét a 20. ábra szemlélteti.



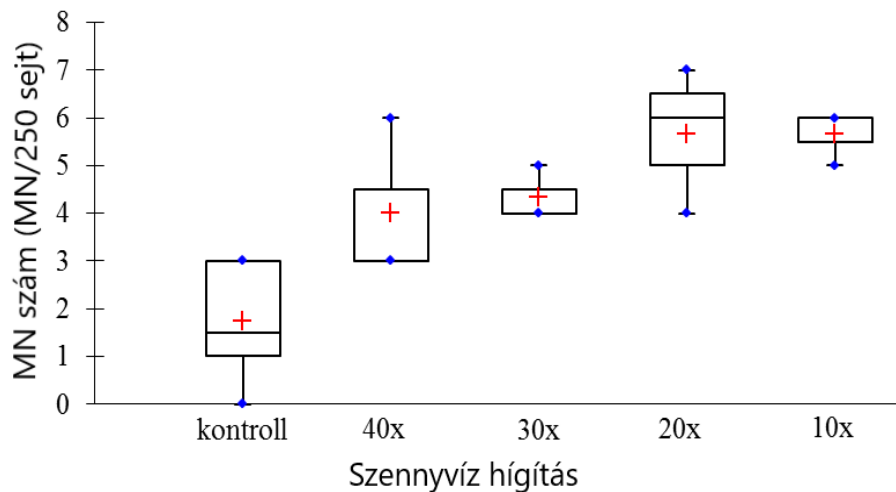
201. ábra: A cserszömörccés kezelés genotoxikus hatása a MN teszttel

A tanninnál említett kettős hatáshoz hasonlóan figyeltek meg cserszömörce metanolos kivonatának vizsgálatakor *Drosophila melanogaster* egyedeken. A növény 5%-os metanolos kivonata egyértelmű genotoxikus hatást fejtett ki, míg az ugyanazon oldat alacsonyabb koncentrációjával (2%) való utókezelés hatásosnak bizonyult a kiváltott károsodás csökkentésében (Stanič et al, 2009, 2011). A tényyszerűség kedvéért meg kell jegyezni, hogy az említett tanulmányokban metanolos kivonatot alkalmaztak, így a cserszömörce vizes extraktumának genotoxikus hatásáról nem érhetőek el szakirodalmi adatok. A gyógynövények biztonságos használatára a WHO is felhívja a figyelmet (WHO, 2004); az általam vizsgált vizes kivonat megfelel a cserszömörce teaként való elkészítésének. A tesztelt koncentrációkban a *C. coggyria* nem bizonyult genotoxikusnak, így alapul szolgálhat a biztonságos mennyiség fogyasztásához.

3.2.2. Szennyvíz

3.2.2.1. Kommunális szennyvíz

A genotoxikus hatást a kagyló MN teszt esetében a MN számmal (MN/250 sejt), az Ames teszt esetében a pozitív kutak százalékaival, az SOS Chromotest-nél pedig az IF értékkel fejeztem ki. A MN teszt eredményét a 21. ábra szemlélteti.



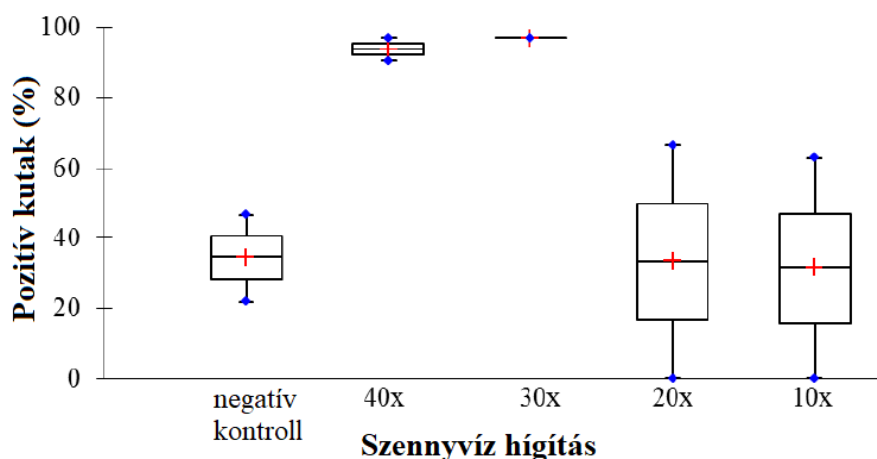
21. ábra: A szennyvízre kapott MN számok a kommunális szennyvíz koncentráció függvényében

A MN számokon végzett statisztikai elemzés a kontrollhoz képest csak a 40-szeres hígításnál nem adott szignifikáns eltérést, az ANOVA teszt egyértelműen szignifikánsnak jelezte a kezelés hatását ($p=0,005$, $F=6,784$, $df=4$). A pontos adatokat az alábbi táblázatban összegeztem (4. táblázat).

4. táblázat: A kommunális szennyvíz kezelésre kapott MN értékek

Kezelés	MN szám (MN/250 sejt)	Kontrolltól való eltérés p értéke
Kontroll	$1,75 \pm 1,16$	
40x	$4,00 \pm 0,73$	0,131
30x	$4,33 \pm 0,58$	0,075
20x	$5,67 \pm 1,53$	0,008
10x	$5,67 \pm 0,58$	0,008

A fluktuációs Ames teszttel a vizsgált szennyvíz minta által kiváltott genotoxikus hatás már a legalacsonyabb koncentrációnál megfigyelhető volt. A 22. ábrán – amely az S9 aktivációval végzett teszt eredményeit szemlélteti – látható, hogy a 40-szeres és 30-szoros hígítás erős genotoxikus jelleget mutat, míg a koncentráltabb szennyvíz nem különbözik szignifikánsan a kontrolltól. Ez a jelenség annak tudható be, hogy a töményebb minták esetében citotoxikus hatás is fellépett, ami elpusztította a baktériumokat, így fals negatív eredményt adott. A metabolikus lebomlás nélkül – S9 aktiváció nélkül – végzett teszt egyetlen hígításnál sem mutatott ki genotoxikus hatást.



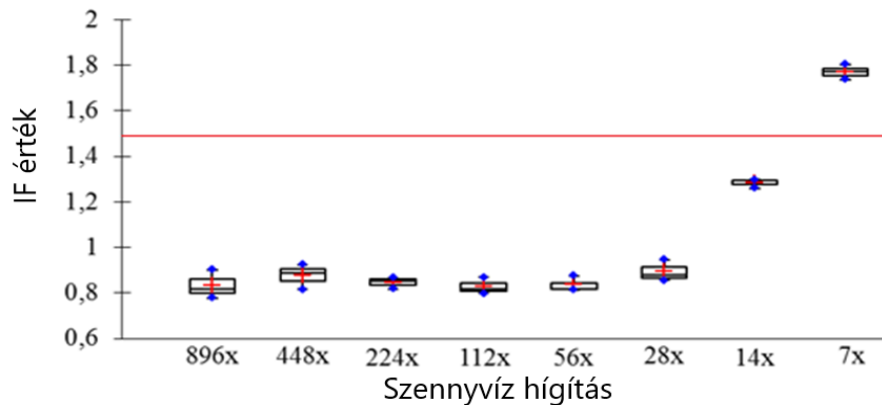
22. ábra: Az Ames teszt során a kommunális szennyvíz mintára kapott pozitív kutak százaléka az egyes hígításokra

A szennyvízen végzett Ames teszt eredményeit és a khinégyszet-próbák értékeit az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Az Ames tesztre kapott pozitív kutak százalékos aránya a kommunális szennyvíz mintára

Kézelés	Átlag	χ^2
Negatív kontroll	34,38 ± 17,68	
40x	93,75 ± 4,42	7,4*10 ⁻⁷
30x	96,88 ± 0,00	1,4*10 ⁻⁷
20x	33,33 ± 47,14	0,746
10x	31,48 ± 44,52	0,639

Az SOS Chromotest-tel a szennyvíz csak S9 aktivációval mutatott genotoxikus hatást, azt is csak a legtöményebb mintánál, a 7-szeres hígításnál. Az alábbi ábrán látható az egyes hígítások IF értéke, genotoxikus hatás az 1,5-ös IF értéket jelölő piros vonal fölötti értéknél figyelhető meg (23. ábra).



23. ábra: A kommunális szennyvíz SOS Chromotesttre kapott SOS Indukciós Faktor értéke S9 aktivációval

Érzékenység szempontjából az Ames teszt adta a legerősebb választ, mivel ez gyakorlatilag maximális genotoxikus hatás jelzett már a 40-szeres hígításnál. Az Ames teszttel azonban két szempontból is körültekintően kell eljárni. Az egyik az a metabolikus lebontás figyelembevételére alkalmazott S9 aktivitás, ami sok szennyező esetében szükséges a teljes vizsgálathoz. A másik a koncentráció helyes megválasztása, mivel a magas koncentrációk esetében fellépő citotoxikus hatás fals negatív eredményt adhat. A másik bakteriális teszt, az SOS Chromotest érzékenysége jelentősen elmarad az Ames tesztől, hiszen csak a legtöményebb mintában mutatott genotoxikus jelleget, azt is csak S9 aktiválás után. A mikronukleusz teszt ugyan csak a 10-szeres és 20-szoros hígításnál adott szignifikáns genotoxikus választ, de a koncentráció-válasz görbe alapján viszonylag egyértelmű összefüggést mutatott a teljes hígítási sorra.

A két bakteriális teszt érzékenysége és alkalmazhatósága jelentősen eltért egymástól. Mint ahogy már említésre került, a környezetvédelmi és vízügyi miniszter 27/2005. (XII. 6.) KvVM rendelete szabályozza a kimenő (kezelt) szennyvíz minőségének ellenőrzésére szolgáló paramétereket, ill. a minősítésre alkalmazható teszteket. Genotoxicitás minősítésére a rendelet javasolja az SOS Chromotest-et, megadva a teszt végrehajtását pontosan leíró szabványt is: SOS Chromotest OECD Test No. 471. Az SOS Chromotest nemzetközi ajánlásokban is szerepel (Wadhia & Thompson, 2007), ugyanakkor nemcsak méréseink során mutatott

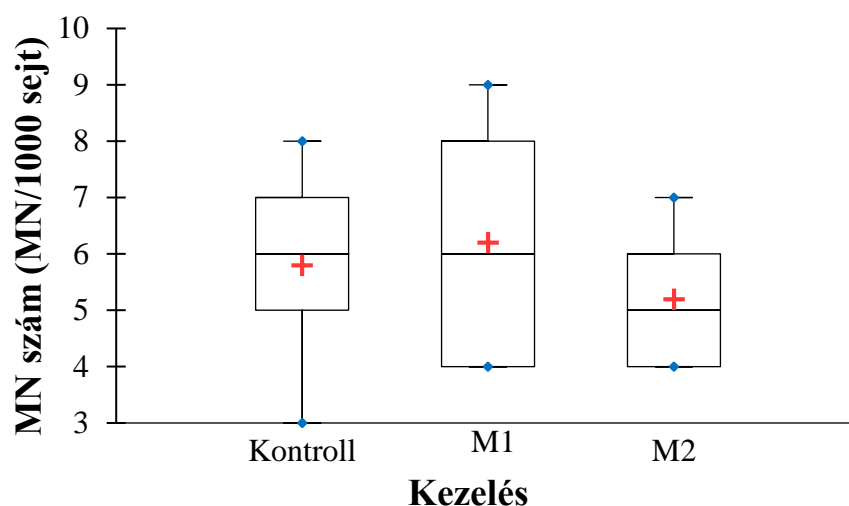
alacsony érzékenységet a vizsgált édesvízi kagyló mintákra, más szerzőknek is hasonlóak a tapasztalataik (pl. Jolibois és Guerbet 2005a, b, 2006). Az Ames-teszt, bár az említett rendelet nem tartalmazza, egyértelműen érzékenyebb. Elvégzése során egyetlen hátrányként talán az említhető meg, hogy steril mintát igényel.

Ellentétben a plate-re kiserelt, ezáltal párhuzamosan több minta elemzését lehetővé tevő bakteriális tesztekkel, a MN tesztnek nagy a helyigénye, egy minta elemzéséhez 4 koncentrációt és három párhuzamost figyelembe véve, legalább 3 l térfogatú akvárium szükséges. Időigénye is jelentős, a kagyló MN tesztre csak az expozíció önmagában 4 nap. Mindezek figyelembevételével az MN teszt nyilvánvalóan nem alkalmas kommunális szennyvízminták rutinjellegű vizsgálatára. Ugyanakkor mivel a bakteriális tesztekhez képest más jellegű mutagén hatást detektál (a bakteriális tesztek DNS-károsodást, az MN teszt pedig sejtsztódás során bekövetkező kromoszómakárosodást mutatnak ki), bizonyos, elsősorban eddig még nem vizsgált minták esetében javasolható az Ames-teszt és a MN teszt együttes elvégzése, a minta lehető legszélesebb körű jellemzése céljából.

Fertőtlenített ivóvíz (nátrium-hipoklorittal, klór-dioxiddal és peroxi-ecetsavval kezelt) genotoxicitásának becslésére végzett teszt sorozatban (összesen 18 teszt cito- és genotoxicitásra) a kagyló MN teszt abban az esetben is pozitív választ adott, amikor egyik baktérium teszt sem mutatott ki genotoxicitást (Monarca et al., 2004). Ilyen esetben az eredmények kiértékelésénél figyelembe kell venni, hogy míg a baktérium tesztek génmutáció kimutatására alkalmasak, addig a MN teszt bizonyos kromoszóma mutációk esetében alkalmazható, így a különböző tesztek eredményei nem mindig fedik egymást (Ye et al., 2014).

3.2.2.2. Gyógyszergyári szennyvíz

A gyógyszergyári szennyvíz esetében a MN teszt nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrolltól sem az előkezelt (M1) sem az elfolyóból származó (M2) mintánál (ANOVA: $df=2$, $F=0,3585$, $p=0,706$; M1 – kontroll Tukey post hoc: $p=0,9398$, M2 – kontroll Tukey post hoc: $p=0,8704$). A két szennyvíz minta MN számai a 24. ábrán láthatóak.



24. ábra: A gyógyszergyári szennyvíz mintákra kapott MN számok

A Flow citometriás mérés a kontrollban és az M1 mintában csupán nagyon alacsony citotoxikus és genotoxikus hatást mért (Mitokondriális aktivitás: K ~87%, M1 ~83%; Oxidált DNS K ~3%, M1 ~3%; DNS fragmentáció (24h) K ~1%, M1 ~1%) míg a szennyvíztisztítóból elfolyó minta (M2) jelentős toxikus hatást mutatott (Mitokondriális aktivitás: M2 ~34%; Oxidált DNS M2 ~14%; DNS fragmentáció M2 ~15%).

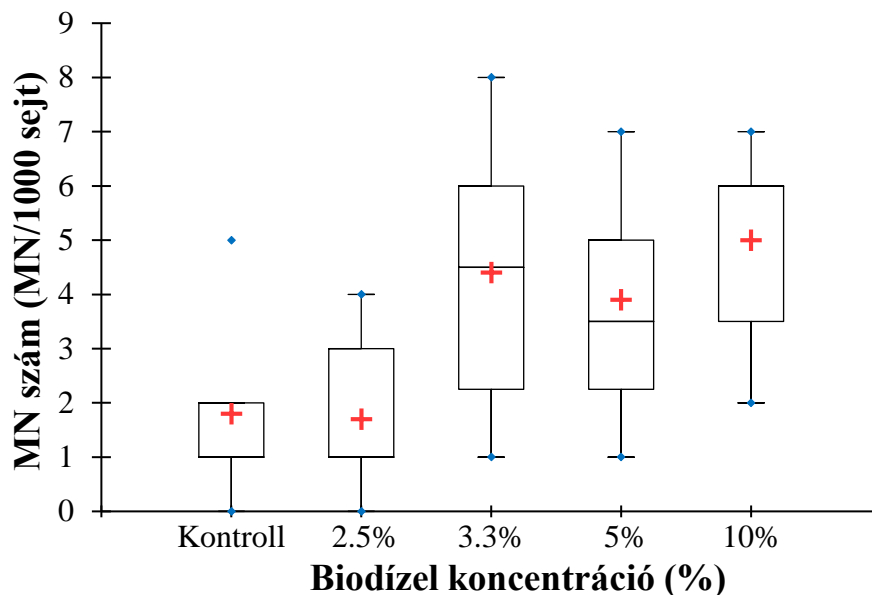
A vizsgált gyógyszergyári szennyvíz mintákra a MN teszt nem adott genotoxicitásra utaló választ, míg a Flow citometriás teszt jelentős toxicitást mutatott a szennyvíztisztítóból elfolyó mintára, azonban az előkezelt gyógyszergyári szennyvíz a kontrollhoz volt hasonló.

A mérés másik célja a két genotoxicitás teszt eredményének összehasonlítása volt. A kagyló MN teszt már több tanulmányban bizonyította érzékenységét gyógyszerekre és genotoxikus szennyvízre is (Parolini et al., 2010; De los Rios et al., 2013). Az eltérő eredmény annak tudható be, hogy bár mind a két alkalmazott teszt kromoszóma mutációk kimutatására alkalmas a mért végpont különböző, így nem a tesztek megbízhatatlanságát jelzi, hanem a genotoxikusan aktív komponensek hatásáról ad információt. A MN teszt a genotoxikus hatásra keletkező MN-ok száma alapján ad választ, amelyhez a MN képződést okozó sejtosztódás során létrejövő kettős DNS száltörések vagy orsózavar szükséges. Mivel a MN teszt negatív eredményt adott genotoxicitásra, ebből következik, hogy a vizsgált minta csak más jellegű DNS károsodást okozott, amelyet a Flow citometriás mérés ki tudott mutatni (Kakasi et al., 2016).

Mint ahogy a kommunális szennyvíz esetében is ajánlott volt két különböző genotoxicitás teszt elvégzése, úgy a gyógyszergyári szennyvíz esetében szükséges volt. Egy adott mintára különböző tesztekkel kapott eredmények közül mindig a legerősebb toxikus hatást kimutatót kell figyelembe venni és ezt lehet a határértékek megállapítására is felhasználni.

3.2.3. Biodízel

A mikronukleusz teszt esetében a genotoxikus hatást mértük, amit MN/1000 sejt alakban kaptunk meg. Mivel ez a teszt nem alkalmas EC50 érték számítására, a mért adatokon statisztikai vizsgálatot végeztünk a kontrolltól való különbség meghatározására. Az egyes koncentrációk esetében tapasztalt MN számokat a 25. ábra szemlélteti.



25. ábra: Abiodízeltre mért MN számok 1000 sejtre vonatkoztatva a koncentráció függvényében

Az egyutas ANOVA alapján $p=0,00025$ ($F=6,7152$, $df=4$), tehát a koncentráció változása szignifikáns hatással van a MN számra. Ezután kétmintás t-próbát végeztünk, hogy meghatározzuk az egyes koncentrációk kontrolltól való eltérésének mértékét. A 40-szeres hígítás esetében a különbség nem szignifikáns ($p=0,882$) 30-szoros ($p=0,009$), 20-szoros ($p=0,019$) és 10-szeres ($p=0,0003$) hígítások esetében azonban már az.

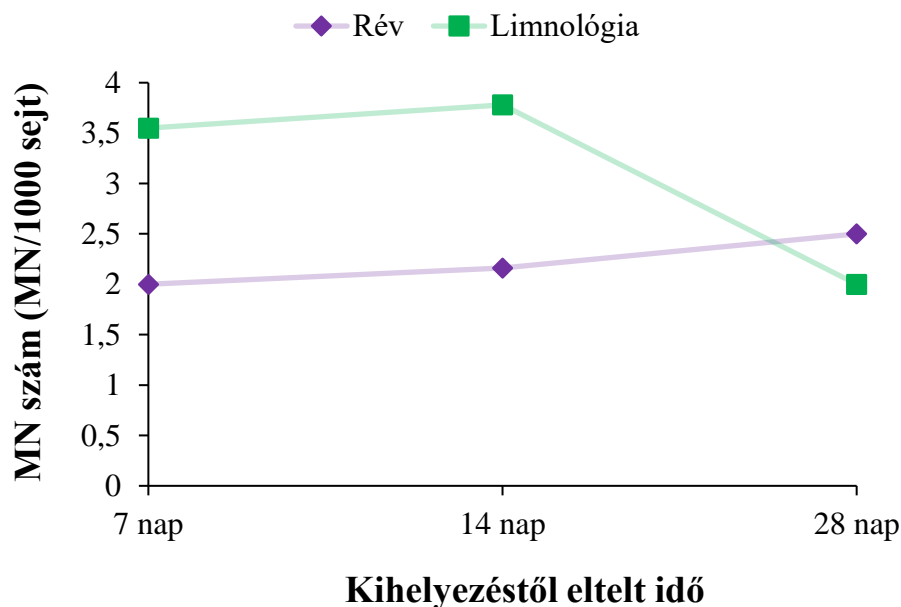
A Flow citometriás mérés során a 30 perces expozíció leteltével az élő/holt sejtarány 82,5% volt, ami nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrolltól ($p=0,0547$). Az egy napos expozíció után azonban a sejtarány lecsökkent 77%-ra, ami viszont már jelentősen eltért a kontrolltól ($p<0,0001$). A rövidtávú, 30 perces mérés után 3%-os DNS fragmentációt tapasztaltunk, ami 24 óra elteltével 7,5%-ra növekedett. A kontrolltól való eltérés mindkét esetben szignifikáns volt ($p<0,0001$). Az adatok alapján elmondható, hogy citotoxikus hatás csak hosszabb expozíció esetén jelentkezett, míg a DNS károsodáshoz már egy rövid érintkezés is elegendő volt.

A biodízel élővizekre gyakorolt hatása több tényezőből tevődik össze. Már az előállítás is nagy mennyiségű öntözővíz felhasználását teszi szükségessé, amit csak részben lehet tengervízzel vagy szennyvízzel helyettesíteni (Wu et al., 2009). A kifröccsent biodízel – mint a többi olajszármazék – egy olajos fázisú réteget képez a víz felszínén, ami ráakódik a tengeri madarakra és minden élőlényre, ami ezzel érintkezik. Bár a biodízel vízben való oldhatósága alacsony, az erős hullámozás és az áramlatok bizonyos fokú keveredést okoznak. A biodízeles kísérleteimhez én is egy hasonló elegyet használtam, ami a vízi ökoszisztémára erősen toxikus és genotoxikus hatást gyakorolt.

A genotoxikus hatás kimutatására alkalmazott mindkét teszt (Flow citometria és MN teszt) pozitív eredményt adott a biodízel mintára. Bár a vizsgált végpontok különbözőek voltak – a MN tesztnél a MN képződés, míg a Flow citometriánál a DNS fragmentáció – a DNS károsodás mindkét módszerrel kimutatható volt.

3.3. Balatoni *In situ* kísérlet

A kihelyezett vizsgálat eredményeként kapott MN értékeket a 26. ábra mutatja az expozíciós idő függvényében mindkét mérési hely esetében.



26. ábra: A Révhez és a Limnológiához kihelyezett kagylók MN szám változása az idő függvényében

A Révnél a teljes 4 hetes vizsgálat alatt kis mértékű, de folyamatos MN szám növekedést tapasztaltam, míg a A Limnológia helyszínénél a MN szám a 2. hétig stagnált, utána folyamatos és jelentős mértékű csökkenést tapasztaltam. ez az érték a 2. és 4. hét között nagy mértékben csökkent. Analitikai vizsgálatok nélkül a változások okáról csak találgatni lehet, az azonban megállapítható, hogy bár rövidebb távon a 4. napi mintavétel esetében van MN szám maximum, bizonyos esetekben hosszabb távú méréseket is érdemes végezni, mert így a lassabb folyamatok hatása is megmutatkozik.

A két mintavételi helyen kihelyezett kagylók mikronukleusz aránya eltérő mintázatot mutatott. A Rév esetében az MN teszt gyakorlatilag elhanyagolható genotoxicitást mutatott, de a MN szám a vizsgálat időtartama alatt kismértékben folyamatosan nőtt. Egy 2006-os tanulmány szerint szignifikáns összefüggés mutatkozott több kikötőben (köztük Tihanyrév-Szántód kompikötő) vett üledékminták réztartalma és az üledék toxicitása között (az MSZ EN ISO 11348-3:2000 szabvány: Vizsgálat fagyasztva szárított baktériumokkal szerint mérve) (Linczmayer, 2006). Mivel a genotoxikus anyagoknak nincs küszöbértékük (tehát DNS károsítás bármilyen kis mennyiség hatására létrejöhet), az expozíciós idővel emelkedő MN szám kis mértékű genotoxikus hatásra utalhat. Az MTA Limnológiai Intézet kikötőjében kihelyezett kagylókat kezdetben magas MN számok jellemezték, ami az utolsó mintavételi időpontra jelentős mértékben lecsökkent. A rendelkezésre álló adatokkal ez a változást nem magyarázható. Az eredmények kiértékeléséhez figyelembe vettem a vizsgált időszak időjárását, valamint az ismerhető antropogén hatásokat (komp menetrend változása, hajóforgalom).

A laboratóriumi körülmények között, rövidebb expozíciós idővel mért vizsgálatok általában a környezetben előfordulhatónál magasabb koncentrációval dolgoznak, hogy megállapíthassák azt a szennyezőanyag mennyiséget, ami már károsodást okoz. Ezzel szemben a környezetben jelenlévő koncentrációk általában alacsonyabbak, ugyanakkor a jelen lévő anyagok hatása összeadódhat. A különböző szennyezőanyagok jelenlétének és mennyiségének a kagylók filtrációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata során kétféle változást figyeltek meg: lerövidültek az aktív filtrációs időszakok, valamint csökkent az átszűrt víz mennyisége. A mért változások ugyanakkor nem mutattak egyértelmű összefüggést a koncentrációval, egy bizonyos határ fölött minden koncentrációnál megjelentek kisebb-nagyobb mértékben (Moubad et al., 2012). Azt, hogy a filtrációs aktivitás csökkenését a szennyezőanyag hatása váltja-e ki, vagy a kagylók azért csökkentik az átszűrt víz mennyiségét, hogy kevesebb szennyezőanyag jusson beléjük, egyelőre nem tudni. Mivel ezt a hatást még a filtráció mérésével is nehéz egyértelműen kimutatni, a laboratóriumi mérések során célszerűbb hosszabb koncentráció sorral dolgozni,

ami az alacsonyabb koncentrációk felé van eltolva, így a mért trend segíti az eredmények kiértékelését.

A kagylókat viszonylag kislyukú hálós zsákokban helyeztem ki, azonban a 4 hét alatt így is több egyed megszökött. Hasonló vizsgálatokhoz a továbbiakban érdekesebb fém ketreceket használni a kihelyezéshez, amelyekben a víz akadálytalanul áramlik, azonban a kagylók nem jutnak belőle ki. Az eredmények szempontjából fontos lehet az időjárás és egyéb külső paraméterek nyomon követése. A vizsgálatom időszaka alatt ugyan nagyrészt nyugodt volt az idő, csupán egyszer volt nagyobb szél, de az éppen a 2. mintavétel után, így nem okozott semmilyen változást. Az időjárás azonban fontos tényező lehet, hiszen az erős szél felkavarhatja az iszapot (különösen a Balatonhoz hasonló sekély vízü tavaknál) és az ott leülepedett szennyezők visszakerülnek a vízbe. Folyók esetén az áradások és apadások időszaka lehet befolyásoló tényező a teszt eredményének kiértékelésében.

4. Konklúziók és összefoglalás

Egykomponensű mintákkal (rézszulfát és benzapirén) vizsgáltam az *U. pictorum* és a *S. woodiana* érzékenységet annak érdekében, hogy megállapítsam, melyik faj lehet jobb tesztalany a kagyló MN tesztben. Bár a két fajt közvetlenül összehasonlítva sem a rézszulfát sem a benzapirén nem okozott szignifikáns eltérést, az egyes koncentrációkra kapott MN számok alapján az *U. pictorum* érzékenyebbnek bizonyult a *S. woodiana*-val szemben. A benzapirén genotoxikus hatását az előbbi már alacsonyabb koncentrációban ki tudta mutatni, míg a rézszulfátnál a meredekebb koncentráció-válasz görbe és a legmagasabb koncentrációnál tapasztalt citotoxikus hatás is érzékenyebb tesztszervezetünk mutatta az *U. pictorum*-ot. A *S. woodiana* invazív faj lévén könnyebben ellenáll bizonyos szennyezőknek, így ezekre toxikológiai tesztekben sem reagál kellő érzékenységgel. Ez azt is jelenti, hogy előzetes várakozással ellentétben, a *S. woodiana* nem válthatja ki genotoxicitás tesztekben a *U. pictorum*-ot.

A rézszulfáttal az *U. pictorum* egyedeken végzett időfüggés vizsgálat kimutatta, hogy laboratóriumi körülmények között 4 napos expozíciós idő esetén jelentkezik a legmagasabb MN szám, hosszabb idő esetén a kagylókból adaptív választ válthat ki a szennyezőanyag, így a MN szám lecsökken. A kagylók mérete és a keletkezett MN-ok között a vizsgált kagyló mérettartományban nem volt szignifikáns hatás. Ez azt jelenti, hogy a kifejlett kagylók érzékenységre az egyedek mérete közötti 10-20%-os eltérés még nem befolyásolja az eredményeket. Ez természetesen csak az egy fajba tartozó, egy területről gyűjtött kagylókra igaz, mivel a származási hely háttérszennyezettsége és egyedi jellemzői továbbra is jelentős különbségeket okozhatnak adott szennyezőre vonatkozóan.

Az *in situ* mérés során azt tapasztaltam, hogy állandó, kismértékű szennyezés esetén a MN szám is állandó szinten marad, míg az egyszeri terhelést követő MN szám emelkedés pár hét alatt visszaáll egy alacsonyabb szintre. A teszt időtartamát ezért mindenképpen a vizsgált minta jellegét és a külső körülményeket figyelembe véve kell kijelölni.

A benzapirén valamint a kommunális szennyvíz kezelésre kapott MN számok szerint a benzapirénre a három teszt (kagyló MN teszt, AMes teszt, SOS Chromotest) egészen hasonló eredményt adott, azonban a tendenciákat tekintve az SOS Chromotest elmaradt a MN teszt és az Ames teszt mögött. A szennyvíz minta vizsgálata ennél összetettebb eredményt mutatott. Az SOS Chromotest csak a legtöményebb mintát találta genotoxikusnak, míg az Ames teszt a két legtöményebb hígításra a citotoxikus hatás miatt fals negatív választ adott. A MN teszt csak a két legtöményebb mintánál mutatott ki szignifikáns genotoxikus hatást, bár a koncentráció-

válasz görbén a legkisebb hígítástól egyenletes MN szám emelkedés látható. Az egykomponensű szennyezőanyagok hatásmechanizmusa kiismerhető, így mindegyikhez kiválasztható a legmegfelelőbb teszt vagy tesztek. Az összetett környezeti minták vizsgálatához azonban, mindenképpen ajánlott többféle, különböző hatásmechanizmuson alapuló toxicitási teszt elvégzése.

Az allelopatikus hatással bíró növényi kivonatok többsége a kontrollhoz képest magas MN számokat eredményeztek, amelyek több növény esetében is összefüggtek azok tannin tartalmával, bár a kivételek miatt ez a kapcsolat nem általánosítható. A csersav tartalmú allelopatikus növények genotoxicitásának vizsgálatára a MN teszt alkalmazható, de meg kell jegyezni, hogy a kontrollhoz képest szignifikáns eltérést mutató koncentrációk kialakulása a természetben nem valószínű.

A tesztek összevetéséből és a biodízel fizikai-kémiai tulajdonságaiból kiderül, hogy az eredmények közötti nagy különbségek részben a biodízel ambivalens tulajdonságaira vezethetők vissza. Az édesvízi *Unio pictorum*-ot használó kagyló mikronukleusz teszt jelentős genotoxikus potenciált mutatott a vizsgált biodízel mintánál, a mikronukleusz képződést már 3,3% -os koncentrációban kimutatható volt. Ez volt az első alkalom, hogy ezt a biológiai vizsgálatot a biodízel genotoxicitás vizsgálatára alkalmazták, így a vizsgálat egyik célja a hasonló mintákon való alkalmazhatóságának felmérése és értékelése volt. A mikronukleusz-teszt tapasztalataim alapján megfelelő eszköz reprezentativitása, érzékenysége és költséghatékonysága alapján is, azonban a teljes ökológiai kockázat felméréséhez mindenképpen ajánlott még más tesztek alkalmazása is.

A vizsgálataim során gyűjtött tapasztalatok alapján a MN teszt előnyei mellett a hátrányairól sem lehet megfeledkezni. A kagyló mikronukleusz tesztet több szempontból értékelve a viszonylag hosszú expozíciós ideje számíthat hátránynak, bár a magasabb rendű élőlényeken végzett tesztek a legtöbb esetben hosszabb idejűek, mint a baktérium tesztek vagy az alacsony rendű állatokon végzett vizsgálatok. A gyorsan bomló szennyezőanyagok esetében megoldást jelenthet, ha a tesztet szemisztatikus jelleggel végezzük, vagy átfolyós akváriumokkal dolgozunk, hogy a koncentráció állandó legyen. A MN teszt sok munkaidő ráfordítást igényel és a MN-ok azonosítása kifejezetten gyakorlott munkaerőt kíván és még így sem küszöbölhető ki teljesen az emberi hiba. A sejtek számolását és a MN-ok azonosítást sejszámláló szoftver alkalmazásával lehetne megkönnyíteni és meggyorsítani, ami jelentősen csökkentené a kiértékelési fázis munkaerő igényét, viszont megemelné a teszt fajlagos költségeit. Vizsgálataim alapján ugyanakkor a MN teszt számos szennyezőanyag és vegyes összetételű környezeti minta genotoxikus potenciáljának felmérésében lehet hasznos.

Tézispontok

1. Az *U. pictorum* és *S. woodiana* kagylókon elvégzett MN teszt eredményét befolyásoló külső faktorok közül az expozíciós idő optimális hossza laboratóriumi méréshez 4 nap, ezután csökken a MN képződés. Az egyedek mérete közötti kb. 10%-os eltérés a vizsgált tartományban nem volt hatással a MN számra.
2. Munkám során *U. pictorum* és *S. woodiana* egyedek érzékenységét vizsgáltam az MN teszttel benzapirén és rézszulfát mintákra. A két vizsgált faj érzékenysége közötti eltérés bár nem volt szignifikáns, a *S. woodiana* mindkét szennyező esetén alacsonyabb MN számokat mutatott. Megállapítottam, hogy az invazív *S. woodiana* nem váltja ki az őshonos *U. pictorum*-ot a rézszulfát és a benzapirén genotoxikus hatásának meghatározása során a kagyló MN tesztben.
3. A benzapirén és kommunális szennyvíz mintákat a MN teszt mellett két baktérium teszttel is vizsgáltam. Eredményeim alapján a baktérium tesztekkel való összehasonlítás a MN teszt érzékenységét az Ames teszt és az SOS Chromotest közé teszi, alig elmaradva az Ames tesztől. Mivel az elvégzett tesztek különböző DNS károsító mechanizmusokat kimutatására alkalmasak, érdemes a MN teszttel párhuzamosan egy baktérium tesztet is elvégezni.
4. A biodízel vizsgálata MN teszttel kimutatta a minta genotoxikus jellegét már a 30-szoros hígításnál. Eddig még nem volt példa a biodízel genotoxikus hatásának felmérésére kagyló MN teszttel, azonban az eredményekből látható, hogy kagylók is alkalmasak erre a célra. A kapott toxicitás értékek emellett felhívják a figyelmet a biodízel vízi ökoszisztémákra fennálló magas kockázatára.
5. Az allelopatikus hatású növények genotoxicitás vizsgálatára a MN teszt teljes mértékben alkalmasnak mutatkozott. Figyelembe véve, hogy az analitikailag meghatározott tannin tartalommal nem minden esetben mutatott összefüggést a kapott MN szám, a növények genotoxikus karakterének kialakításában más vegyületek is szerepet játszhatnak.
6. Az *in situ* kísérletek tapasztalatai alapján a kagyló MN teszt alkalmas már viszonylag alacsony környezeti terhelés kimutatására is. Az expozíciós idő itt is jelentősen befolyásolja az MN képződés gyakoriságát. A kiértékeléshez fontos a kísérlet ideje alatt az időjárási viszonyok és az antropogén hatások nyomonkövetése.

Theses

1. The most important external factor that can have an impact on the results of an MN test is the exposure time because the MN genesis starts to reduce after four days, so this is the optimal length of time for the measurements in a laboratory. Approximately 10% difference between the size of the individuals had no effect on the MN number in the test range.
2. During my work I have examined how sensitive the species *U. pictorum* and the *S. woodiana* reacts for BaP and copper sulfate. Even though the difference of the sensibility of the two species was not significant the *S. woodiana* mussel has shown lower MN numbers by each of the contaminants. I have determined that the invasive chinese pond mussel can't substitute the native painter's mussel by the determination of the genotoxic effect of the BaP and copper sulfate mussel MN tests.
3. I have examined the BaP and the communal waste water samples besides the MN test with two bacteria tests. Due to my results the sensitivity level of the MN test is between the one of the Ames test and the one of the SOS Chromotest, barely lagging to the one of the Ames test. Since the done tests are used to reveal different kind of DNS impairing mechanisms it is useful to make a bacteria test parallel with the MN test.
4. The testing of the Biodiesel with the MN test has shown the genotoxic nature of the sample already by a 30% dilution. This far there was no example that someone examined the genotoxic nature of the biodiesel with a mussel MN test but the results show that the mussels can be used to such purpose. The toxicity values draw attention to the high hazard of the biodiesel for the watery ecosystems.
5. The MN test has shown in a complete manner that it can be used to examine the genotoxicity by plants with allelopathic impact. Considering that the MN number has not shown a correlation in every cases with the analytically specified amount of tannin, in the shaping of the genotoxic character of plants other compounds do play a role as well.
6. Based on the experiences of the *in situ* test the mussel MN test is capable to determine even relatively low environmental load. The exposure time makes a significant influence to the MN genesis in this case as well. By doing the evaluation of the results it is important to take in account the results of the monitoring of the weather circumstances and of that of the anthropogenic effects.

Irodalomjegyzék

- AFNOR (2000): Association française de normalisation. Norme NFT90-325. Qualité de l'Eau. Evaluation de la genotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (*Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltl*)
- Aldridge, D. C. (1999): The morphology, growth and reproduction of *Unionidae* (Bivalvia) in a fenland waterway. *Journal of Molluscan Studies*, 65(1): 47-60.
- Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. (1973): An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. – Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 70(3): 782-786.
- Arbuckle, K. E., & Downing, J. A. (2002): Freshwater mussel abundance and species richness: GIS relationships with watershed land use and geology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(2): 310-316. <https://doi.org/10.1139/f02-006>
- ASTM (2006): International standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels /E2455-05/ <https://doi.org/10.1520/E2455-06R13>
- Azrul, L. M., Nurulaini, R., Adzemi, M. A., Marina, H., Effendy, A. W. M. (2014): Tannins quantification in *Terminalia catappa* leaves extract and antihelminthic potential evaluation. *Journal of Natural Products*, 7: 98-103. ISSN 0974 – 5211
- Balogh, Cs., Muskó, I. B., G.-Tóth, L. (2008): A vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) szerepe a Balatonban mennyiségének és filtrációjának tükrében. *Hidrológiai közlöny*, 88(6): 12-14.
- Balogh, Cs., G.-Tóth, L., Csaba, J., Serfőző, Z. (2014): Az amuri kagyló, mint az invazív kagylók megtelepedésére alkalmas felület (előzetes eredmények). *Ecology of Lake Balaton*, 2: 43-50.
- Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameer, S., Boussetta, H. (2010): Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(5): 842-848.
- Baranyai, S. (1980): Research and Regulation of the Lake Balaton, Publications of Research Institute for Water Management. Budapest.
- Barnhart, M. C. (2006): Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels. *Aquaculture*, 254(1-4): 227-233.
- Báskay, I., Dobó, Z., Péntes, B. (1996): Az amuri kagyló okozta glochidiózis vizsgálata. *Állattani Közlemények*, 95(1): 9-14.

- Bauer, G. (1992): Variation in the life span and size of the freshwater pearl mussel. *Journal of Animal Ecology*, 61: 425-436.
- Bedford, J. W., Roelofs, E. W., Zabik, M. J. (1968): The freshwater mussel as a biological monitor of pesticide concentrations in a lotic environment. *Limnology and Oceanography*, 13(1): 118-126.
- Benkő-Kiss, Á., Ferincz, Á., Kováts, N., Paulovits, G. (2013): Spread and distribution pattern of *Sinanodonta woodiana* in Lake Balaton. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 408(09). <https://doi.org/10.1051/kmae/2013043>
- Bernstein, C., Prasad, A. R., Nfonsam, V., Bernstei, H. (2013): DNA Damage, DNA Repair and Cancer. In *New Research Directions in DNA Repair*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53919>
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., Schøyen, M. (2017): Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research* 130: 338-365.
- Bian, X., Liu, H., Gan, J., Li, R., Yang, J. (2009): HCH and DDT residues in bivalves *Anodonta woodiana* from the Taihu Lake, China. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(1), 67-76. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9173-y>
- Bierkens, J., Brits, E., & Verschaeve, L. (2005): Environmental monitoring for genotoxic compounds. In *Environmental toxicity testing*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, ISBN-10: 1-4051-1819-9.
- Bodnár, E., Abonyi, J., Hlavay, J. (2003): The Budget of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) of the Lake Balaton, *Proceeding of ISPAC 19*: 196.
- Bodnár, E., Hlavay, J., Abonyi, J. (2004): Distribution of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of lake Balaton, Hungary. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24(4-5): 791-803.
- Bolognesi, C. & Fenech, M. (2012): Mussel micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 7(6): 1125-37. <http://doi.org/10.1038/nprot.2012.043>
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P., Rossi, C. (2004): Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment* 333(1-3): 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.018>

- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., Sciutto, A. (2006): Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. *Marine Environmental Research*, 62: 287-291. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.047>
- Bonnail, E., Sarmiento, A. M., DelValls, T. A., Nieto, J. M., Riba, I. (2016): Assessment of metal contamination, bioavailability, toxicity and bioaccumulation in extreme metallic environments (Iberian Pyrite Belt) using *Corbicula fluminea*. *Science of the Total Environment* 544: 1031-1044.
- Brander, T. (1956): Über Dimensionen, Gewicht, Volumen und Alter grosswüchsiger europäischer Unionazeen. *Archiv Molluskenkunde*, 85: 65-68.
- Brown, A. L. (1971): *Ecology of fresh water*. Heineman. XI. London 44 p., 129 p
- Cataldo, D, Colombo, J. C., Boltovskoy, D., Bilos, C., Landoni, P. (2001): Environmental toxicity assessment in the Parana river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environmental Pollution*, 112: 379-389.
- Chappie, D. & Burton, G. A. (2000): Applications of aquatic and sediment toxicity testing *in situ*. *Soil and Sediment Contamination*, 9(3): 219-245.
- Chen, W. Y., Jou, L. J., Chen, S. H., Liao, C. M. (2012a): A real-time biomonitoring system to detect arsenic toxicity by valve movement in freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology*, 21(4): 1177-1187.
- Chen J., Zhang H., Han Z., Ye J., Liu Z. (2012b): The influence of aquatic macrophytes on *Microcystis aeruginosa* growth. *Ecological Engineering*.; 42: 130-133.
- Chukwujekwu, J. C. J. & Van Staden, J. (2014): Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. *South African Journal of Botany*, 92: 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.001>
- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., et al. (2011): Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(24): 1827-1839. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr483>
- Comfort A. (1957): The duration of life in molluscs. *Proceedings of the Malacological Society of London* 32, 219-241.
- Curieux F., Giller S., Gauthier L., Erb F., Marzin D. (1995): Study of the genotoxic activity of six halogenated acetonitriles, using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. *Mutation Research* 341: 289-302.
- D'Adamo, R., Pelosi, S., Trotta, P., Sansone, G. (1997): Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56: 45-49.

- Das, R. K. & Nanda, N. K. (1986): Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Researche*, 175: 67-71.
- De los Ríos, A., Pérez, L., Ortiz-Zarragoitia, M., Serrano, T., Barbero, M. C., Echavarri-Erasun, B., Juanes, J. A., Orbea, A., Cajaraville, M. P. (2013): Assessing the effects of treated and untreated urban discharges to estuarine and coastal waters applying selected biomarkers on caged mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 77: 251-265.
- Degrassi, F. & Rizzoni, M. (1982): Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 97(1): 19-33. ISSN 0165-1161
- Deutschmann, B., Kolarevic, S., Brack, W., Kaisarevic, S., Kostic, J., Kracun-Kolarevic, M., Liska, I., Paunovic, M., Seiler, T. B., Shao, Y., et al., (2016): Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. *Science of the Total Environment* 573: 1441-1449.
- Douda, K., Vrtílek, M., Slavík, O., Reichard, M. (2012): The role of host specificity in explaining the invasion success of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* in Europe. *Biological Invasions*, 14: 127-137.
- Dudgeon, D. & Morton, B. (1984): Site selection and attachment duration of *Anodonta woodiana* (Bivalvia: *Unionacea*) glochidia on fish hosts. *Journal of Zoology*, 204: 355-362.
- Dudgeon, D. (2010): Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: linking ecosystem structure and function. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2: 422-430.
- Eck-Varanka, B., Horváth, E., Ferincz, Á., Paulovits, G., Kováts, N. (2014): Comparative assessment of the mussel micronucleus test versus bacterial bioassays for genotoxicity testing of benzo [a] pyrene. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 42(1): 1-5.
- Eck-Varanka, B., Kováts, N., Hubai, K., Paulovits, G., Ferincz, Á., Horváth, E. (2015): Genotoxic effect of *Lythrum salicaria* extract determined by the mussel micronucleus test. *Acta Biologica Hungarica*, 66(4): 460-463.
- Eck-Varanka, B., Kováts, N., Horváth, E., Ferincz, Á., Kakasi, B., Nagy, S. T., Imre, K., Paulovits, G. (2018): Eco-and genotoxicity profiling of a rapeseed biodiesel using a battery of bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151: 170-177.

- Eck-Varanka, B. M., Kováts, N., Paulovits, G., Horváth, E. (2016): Assessment of municipal wastewater genotoxicity using the Ames fluctuation test, the SOS Chromotest and the mussel micronucleus test: a comparison. *International Journal of Environmental Engineering*, 3(1): 135-138.
- Eck-Varanka, B. M., Kováts, N., Hubai, K. E., Paulovits, G., Ferincz, Á., Horváth, E. (2016): Screening potential genotoxic effect of aquatic plant extracts using the mussel micronucleus test. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(1): 36-38.
- Evariste, L., David, E., Cloutier, P. L., Brousseau, P., Auffret, M., Desrosiers, M., Groleau, P. E., Fournier, M., Betoulle, S. (2018): Field biomonitoring using the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the quagga mussel *Dreissena bugensis* following immunotoxic responses. Is there a need to separate the two species? *Environmental Pollution*, 238: 706-716.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Osadchuk, O. Y., Farkas, A., Vehovszky, A., Carpenter, O., Gyori, J., Stoliar, O. B. (2014): Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 164: 51-58.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Stoliar, O. B. (2013): Effect of *in situ* exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (*Unionidae*) to trace metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89: 73–83.
- Falus, A., László, V., Tóth, S., Oberfrank, F., Pap, E. (2014): *Genetika és genomika*. Budapest, Typotex Kiadó. ISBN: 978-963-279-185-2
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0079_szalai_genetika_hu/index.html
- Farris, J. L. & Van Hassel, J. H. (2006): *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. CRC Press, ISBN: 9781420042856, <https://doi.org/10.1201/9781420042856>
- Faucet, J., Maurice, M., Gagnaire, B., Renault, T., Burgeot, T. (2004): Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science*, 25: 177-184.
- Fennell, C. W., Lindsey, K. L., McGaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I., Elgorashi, E. E. (2004): Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 205-217.
- Foltête, A. S., Dhyèvre, A., Féraud, J. F., Cotellet, S. (2011): Improvement of Vicia-micronucleus test for assessment of soil quality: A proposal for international standardization. *Chemosphere*, 85(10): 1624-1629. ISSN 0045-6535

- Friedberg, E. C. (2003): DNA damage and repair. *Nature* 421(6921): 436.
<https://doi.org/10.1038/nature01408>
- Gačić, Z., Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2014): The impact of *in vivo* and *in vitro* exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environmental Pollution*, 191: 145-150. ISSN 0269-7491,
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.024>
- Graf, D. L. & Cummings, K. S. (2007): Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: *Unionoida*). *Journal of Molluscan Studies* 73(4): 291-314.
- Graf, D. L. (2007): Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: *Unionoida*) diversity and the comparative method as a species concept. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 156: 71-88.
- Graziano, M. J. & Jacobson-Kram, D. (2015): Chapter 3: Genotoxicity testing of API. In *Genotoxicity and Carcinogenicity Testing of Pharmaceuticals* Springer International Publishing, Switzerland, ISBN: 978-3-329-22083-3, https://doi.org/10.1007/978-3-319-22084-0_3
- Guecheva, T., Henriques, J. A., Erdtmann, B. (2001): Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutation Research* 497(1-2): 19-27.
- Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, B., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., Nigro, M. (2010): Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology*, 100: 75–83.
- Guo, X. & Feng, C. (2018): Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. *Science of The Total Environment*, 631–632: 56-70. ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.019>
- Gust, M., Gélinas, M., Fortier, M., Fournier, M., Gagné, F. (2012): *In vitro* immunotoxicity of environmentally representative antibiotics to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution*, 169: 50-58.
- Gustafson, L. L., Stoskopf, M. K., Bogan, A. E., Showers, W., Kwak, T. J., Hanlon, S., Levine, J. F. (2005): Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: *Unionidae*). *Diseases of Aquatic Organism*,; 65: 159-165.

- Haranghy, L. (1959): A kagylók víztisztító hatása. A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Csoportjának közleményei, 3(3-4): 281-292.
- Hartmann, J. T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B. C., Geist, J. (2016): Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 170: 279-288.
- Hilt, S. & Gross, E. M. (2008): Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? *Basic and Applied Ecology*, 9: 422-432.
- Imlay, M. J. (1982): The use of shells of freshwater mussels in monitoring heavy metals and environmental stresses: a review. *Malacological Review*, 15:1-14.
- ISO 11269-1:2012 Talajminőség. Szennyező anyagok talajflórára gyakorolt hatásának meghatározása. 1. rész: A gyökérnövekedés-gátlás mérési módszere
- ISO 29200:2013-09 (E) Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test
- ISO/EN/DIN 11348-3:2000 Vízhőminőség. Vízminták gátló hatásának meghatározása a *Vibrio fischeri* fénykibocsátására (lumineszcens baktériumteszt). 3. rész: Vizsgálat fagyasztva szárított baktériumokkal
- Istvánovics, V., Clement, A., Somlyódy, L., Specziár, A., László, G., Padisák, J. (2007): Updating water quality targets for shallow Lake Balaton (Hungary), recovering from eutrophication. In *Eutrophication of Shallow Lakes with Special Reference to Lake Taihu, China*, 305-318. Springer, Dordrecht.
- ITIS Integrated Taxonomic Information System <https://www.itis.gov/>
- IUCN Red List 2003, 2013
- Jha, A. N., Cheung, V. V., Foulke, M. E., Hill, S. J., Depledge, M. H. (2000): Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research*, 464: 213-228.
- Ji, Q. & Chen, Y. (1996): *Vicia faba* root tip micronucleus test on the mutagenicity of water-soluble contents of cigarette smoke. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 359(1): 1-6.
- Jiao, Y., Chen, Q., Chen, X., Wang, X., Liao, X., Jiang, L., Wu, J., Yang, L. (2014): Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin β -methylamino-L-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk. *Science of the Total Environment*, 468-469: 457-463.
- Jolibois, B. & Guérbet, M. (2005a): Efficacy of Two Wastewater Treatment Plants in Removing Genotoxins. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 289-295.

- Jolibois, B. & Guerbet, M. (2005b): Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutation Research*, 565: 151-162.
- Jolibois, B. & Guerbet, M. (2006): Hospital Wastewater Genotoxicity. *Annals of Occupational Hygiene*, 50(2): 189-196.
- Jomini, S., Labille, J., Bauda, P., Pagnout, C. (2012): Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO₂ nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO₂-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215: 54-61.
- Jørgensen, C. B. (1991): Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. In *The Quarterly Review of Biology*, 66(3): 353. ISBN: 8785215201, <https://doi.org/10.1086/417296>
- Juan, M., Casas, J. J., Elorrieta, M. A., Bonachela, S., Gallego, I., Fuentes-Rodríguez, F., Fenoy, E. (2014): Can submerged macrophytes be effective for controlling waterborne phytopathogens in irrigation ponds? An experimental approach using microcosms. *Hydrobiologia*, 732: 183-96.
- Jurkiewicz-Karnkowska, E. (1998): The reaction of molluscs to environmental pollution and the possibility of employing them as bioindicators. *Wiadomosci ekologiczne (PL)* 44(3): 217-234.
- Kakasi, B. (2019): Komplex környezeti minták geno- és citotoxikológiai vizsgálata. Doktori értekezés, Pannon Egyetem, Veszprém
- Kakasi, B., Horváth, E., Kováts, N., Eck-Varanka, B. M., Paulovits, G. (2016): Geno- and cytotoxicologic assessment of wastewater effluents with mussel micronucleus assay and with flow cytometric sperm toxicity assay: a comparison. *International Journal of Environmental Engineering*, 3(1): 139-142. ISSN 1756-8463
- Kim, B. H., Lee, J. H., Hwang, S. J. (2011): Interand intra-specific differences in filtering activities between two unionids, *Anodonta woodiana* and *Unio douglasiae*, in ambient eutrophic lake waters. *Ecological Engineering*, 37: 1957-1967.
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., Aardema, M. J., Fenech, M. (2011): Review: *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, 26(1): 177-184. <http://doi.org/doi:10.1093/mutage/geq068>
- Kiss, Á. (1997): Az amuri kagyló (*Anodonta woodiana woodiana* LEA, 1834) balatoni behatolásának nyomon követése a Sió-csatornán keresztül (1994–1996 között). A Balatonkutató Alapítvány által támogatott pályázat eredménye.

- Kiss, Á. (1990): Az amuri kagyló (*Anodonta woodiana woodiana*, LEA 1834) (Mollusca: *Unionoidae*) szaporítása, növekedése és biomasszája.
- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2016): Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Science of The Total Environment*, 40(1): 377-385.
- Kotova, N., Hebert, N., Härnwall, E. L., Vare, D., Mazurier, C., Douay, L., Jenssen, D., Grawé, J. (2015): A novel micronucleus *in vitro* assay utilizing human hematopoietic stem cells. *Toxicology in vitro*, 29: 1897-1905.
- Kováts, N., Abdel-Hameid, N. A., Ács, A., Kárpáti, Á., Paulovits, G. (2010a): Kommunális szennyvíz ökotoxicitásának becslése lapos tavikagyló (*Pseudanodonta complanata*) lárváival. *Állattani Közlemények*, 95(1): 151-154.
- Kovats, N., Abdel-Hameid, N. A., Kovacs, K., Paulovits, G. (2010b): Sensitivity of three unionid glochidia to elevated levels of copper, zinc and lead. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 2010:(399): 01-08.
- Kováts, N., Ferincz, Á., Horváth, E., Eck-Varanka, B., Benkő-Kiss, Á., Weiperth, A., Paulovits, G. (2014): Role of fishponds in the spread of non-indigenous invertebrates in the catchment of Lake Balaton. *Lakes: the Mirrors of Earth. Book of Abstract of the 15th World Lake Conferences*, Perugia.
- Krifaton, Csilla (2012): Biomonitoring rendszerek fejlesztése az alfatoxin-B1 és a zearalenon vizsgálatára. PhD értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő
- Królak, E. & Zdanowski, B. (2001): The bioaccumulation of heavy metals by the mussels *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) and *Dreissena polymorpha* (Pall.) in the heated Konin lakes. *Archives of Polish Fisheries*, 9(2): 229-237.
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40: 701-710.
- La Point, T. W. & Waller, W. T. (2000): Field assessments in conjunction with whole effluent toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(1): 14-24.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620190103>
- Labieniec, M. & Gabryelak, T. (2007): Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu₂₊ ions. *Toxicology In vitro*, 21: 146-56.

- Labieniec, M., Gabryelak, T., Falcioni, G. (2003): Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research*, 539: 19-28.
- Landres, P. B., Verner, J., Thomas, J. W. (1988): Ecological uses of vertebrate indicator species: a critique. *Conservation Biology* 2(4): 316-328.
- Lapinskiene, A., Martinkus, P., Rebzdaite, V. (2006): Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environmental Pollution*, 142: 432-437.
- Large, A. T., Shaw, J. P., Peters, L. D., McIntosh, A. D., Webster, L., Mally, A., Chipman, J. K. (2002): Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 54: 493-497.
- Larsson, D. G., De Pedro, C., Paxeus, N. (2007): Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, 148(3): 751-755
- Le Curieux, F., Marzin, D., Françoise, E. (1993): Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutation Research*, 319: 223-236.
- Le Thi, H., Lin, C. H., Smeda, R. J., Leigh, N. D., Wycoff, W. G., Fritschi, F. B. (2014): Isolation and identification of an allelopathic phenylethylamine in rice. *Phytochemistry*, 108: 109-21.
- Leonard, J. A., Cope, W. G., Hammer, E. J., Barnhart, M. C., Bringolf, R. B. (2017): Extending the toxicity-testing paradigm for freshwater mussels: Assessing chronic reproductive effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the unionid mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 191: 14-25.
- Linczmayer, K. (2006): Toxikus szennyezettség térképezése a Balaton üledékében. (KM diplomadolgozat) Veszprém, Veszprémi Egyetem, Környezetmérnöki és Kémiai Technológia Tanszék
- Liu, H., Yang, J., Gan, J. (2010): Trace element accumulation in bivalve mussels *Anodonta woodiana* from Taihu Lake, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 593-601.
- Lydeard, C., Cowie, R. H., Onder, W. F., Bogan, A. E., Bouchet, P., Clark, S. A., Cummings, K. S., Frest, T. J., Gargominy, O., Herbert et al. (2004): The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, 54(4): 321-330.

- Majoros, G. (2006): Az amuri kagyló [*Anodonta (Sinanodonta) woodiana* (Lea, 1834)] megtelepedése a Balatonban és elszaporodásának várható következményei. *Halászat*, 99: 143-150.
- Marigómez, I., Garmendia, L., Soto, M., Orbea, A., Izagirre, U., Cajaraville, M. P. (2013): Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill ‘‘MusselWatch’’. *Ecotoxicology*, 22: 486-505.
- Mendonça E., Picado A., Paixão S. M., Silva L., Cunha M. A., Leitão S., Moura I., Cortez C., Brito F.: Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *Journal of hazardous materials* vol. 163.2, pp.665-670, 2009.
- Metcalf-Smith J. L.: 1996 Biological water-quality assessment of rivers: use of macroinvertebrate communities. In: G. PETTS, P. CALOW (Eds.), *River restoration*. Blackwell Science, Oxford: 17-43.
- Monarca, S., Zani, C., Richardson, S. D., Thruston, A. D., Moretti, M., Feretti, D., Villarini, M. A. (2004): New approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research*, 38: 3809-3819.
- Mouabad, A., Fdil, M. A., Maarouf, A., Pihan, J. C. (2001): Pumping behaviour and filtration rate of the freshwater mussel *Potomida littoralis* as a tool for rapid detection of water contamination. *Aquatic Ecology*, 35(1), 51-60.
- Mouchet, F., Gauthier, T. L., Mailhes, C., Jourdain, M. J., Ferrier, V., Triffault, G., Devaux, A. (2006): Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox and Ames tests). *Science of the Total Environment*, 355: 232-246.
- Mubiana, V. K., Vercauteren, K., Blust, R. (2006): The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution*, 144(1): 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.017>.
- Nagel, K. O. (2015): Malermuschel, *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) *In Atlas der Fische Hessens - Verbreitung der Rundmäuler, Fische, Krebse und Muscheln*. Hessisches Ministerium für Umwelt, Klimaschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. ISBN: 3981418115, <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1173.2247>
- Naimo, T. J., Damschen, E. D., Rada, R. G., Monroe, E. M. (1988): Nonlethal Evaluation of the Physiological Health of Unionid Mussels: Methods for Biopsy and Glycogen Analysis. *Journal of the North American Benthological Society*, 17(1): 121-128.

- Nguyen, H. L., Leermakersa, M., Osán, J., Török, S., Baeyens, W. (2005): Heavy metals in Lake Balaton: water column, suspended matter, sediment and biota. *Science of the Total Environment*, 340: 213-230.
- OECD (2010): Test No. 487: *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264091016-en>
- OECD (2014): Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224292-en>
- OECD (2004): Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.
- OECD (1997): Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A. (2010): Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 79: 489-498.
- Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A. (2011): Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere*, 84: 91-100.
- Pereira, A. M., Soares, A. M., Gonialves, F., Ribeiro, R. (2000): Water-Column, Sediment, and *in situ* Chronic Bioassays with Cladocerans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47: 27-38
- Petró, E. (1984): The occurrence of *Anodonta woodiana woodiana* in Hungary. *Állattani Közlemények*, 84: 189-191.
- Pilote, M., André, C., Turcotte, P., Gagné, F., Gagnon, C. (2018): Metal bioaccumulation and biomarkers of effects in caged mussels exposed in the Athabasca oil sands area. *Science of the Total Environment*, 610-611: 377-390, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.023>
- Pinto-Silva, C. R. C., Ferreira, J. F., Costa, R. H. R., Filho, P. B., Creppy, E. E., Matias, W. G. (2003): Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon*, 41: 93-97.
- Pipolo, M., Martins, R. C., Quinta-Ferreira, R. M., Costa R. (2017): Integrating the Fenton's Process with Biofiltration by *Corbicula fluminea* to Reduce Chemical Oxygen Demand of Winery Effluents. *Journal of environmental quality*, 46: 436-442.

- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M. D. (2009): Genotoxicity of the Herbicide Formulation Roundup® (glyphosate) in Broad-Snouted Caiman (*Caiman Latirostris*) Evidenced by the Comet Assay and the Micronucleus Test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2): 95-102.
- Ponta, M., Frentiu, T., Sarkany-Kiss, A., Cordosa, E. A. (2002): Traces of Cu, Mn and Zn in Aquatic Animals, Water and Sediments from the Cris River Basin – West Romania. Part II: Distribution Study. *Croatia Chemica Acta*, 75(1): 307-317.
- Popov, B., Petrov, V., Georgieva, S. (2013): Genotoxic effects of copper sulphate in rabbits. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 65(3): 963-967
- Quillardet, P. & Hofnung, M. (1985): The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147: 65-78.
- Quillardet, P., & Hofnung, M. (1993): The SOS chromotest: a review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 297(3): 235-279.
- Rand, G. (1995): *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, Taylor and Francis, New York, ISBN: 1-56032-091-5
- Regoli, F. & Principato, G. (1995): Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implication for a proper use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31: 143-164.
- Rice, E. W. & Bridgewater, L. (2012): *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22 ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Riva, C., Binelli, A., Provini, A. (2008): Evaluation of several priority pollutants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the largest Italian subalpine lakes. *Environmental Pollution* 151: 652-662.
- Rogers, C. L. & Dimock, R. V. (2003): Acquired resistance of bluegillsunfish *Lepomis macrochirus* to glochidia larvae of the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: *Unionidae*) after multiple infections. *Journal of Parasitology*, 89: 51-56.
- Rogers, J. J., Henley, W. F., Weberg, A. G., Jones, J. W., Cope, W. G. (2018): Assessment of growth, survival, and organ tissues of caged mussels (Bivalvia: *Unionidae*) in a river-scape influenced by coal mining in the southeastern USA. *Science of The Total Environment*, 645: 1273-1286
- Roos, W. P. & Kaina, B. (2006): DNA damage-induced cell death by apoptosis. *trends in molecular medicine*, 12(9): 440-50.8

- Rosa, I. C., Costa, R., Gonçalves, F., Pereira, J. L. (2014): Bioremediation of Metal-Rich Effluents: Could the Invasive Bivalve *Corbicula fluminea* Work as a Biofilter? *Journal of environmental quality*, 43: 1536-1545.
- Salánki, J. & V.-Balogh, K. (1989): Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. *Hydrobiologia*, 188(1): 445-453.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1): 9-15.
- Siu, W. H. L., Cao, J., Jack, R. W., Wu, R. S. S, Richardson, B. J., Xud, L., Lama, P. K. S. (2004): Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66: 381-392.
- Smith, D. (2001): *Pennak's Freshwater Invertebrates of the United States: Porifera to Crustacea*, Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-35837-1
- Štambuk, A., Pavlica, M., Vignjević, G., Bolarić, B., Klobučar, G. I. V. (2009): Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*. *Ecotoxicology*, 18: 430-439.
- Stanić, S., Matić, S., Đelić, G., Mihailović, M., Bogojević, D., Solujić, S. (2011): Study of genotoxicity and antigenotoxicity of the *Cotinus coggygia* Scop. methanol extract by *Drosophila melanogaster* sex-linked recessive lethal test. *Russian journal of genetics*, 47(7): 770-774.
- Stanić, S., Matić, S., Solujić, S., Milošević, T. (2009): Genotoxicity testing of the methanol extract of the plant *Cotinus coggygia* and gallic acid on *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biological Sciences*, 61(2): 261-266.
- Steiner, S., Czerwinski, J., Comte, P., Popovicheva, O., Kireeva, E., Müller, L., Heeb, N., Mayer, A., Fink, A., Rothen-Rutishauser, B. (2013): Comparison of the toxicity of diesel exhaust produced by bio- and fossil diesel combustion in human lung cells *in vitro*. *Atmospheric Environment*, 81: 380-388.
- Švanys, A., Paškauskas, R., Hilt, S. (2014): Effects of the allelopathically active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community: a mesocosm study. *Hydrobiologia*, 737: 57-66.
- Swaileh, K. M. & Adelung, D. (1994): Levels of trace metals and effect of body size on metal content and concentration in *Arctica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western Baltic. *Marine Pollution Bulletin*, 28(8): 500-505. ISSN 0025-326X, [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)90524-X](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)90524-X).

- Terahara, K., Takahashi, K. G., Mori, K. (2003): Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 521-528.
- Theisen, A. & Shaffer, L. G. (2010): Disorders caused by chromosome abnormalities. The application of clinical genetics, 3: 159-174.
- Udroiu, I. (2006): Review: The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79: 201-204.
- Uno, S., Shiraishi, H., Hatakeyama, S., Otsuki, A., Koyama, J. (2001): Accumulative characteristics of pesticide residues in organs of bivalves (*Anodonta woodiana* and *Corbicula leana*) under natural conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 35-47.
- USEPA (1994): Water Quality Standards Handbook. EPA-823-B-94-005. EPA Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC.
- Vanderstukken, M., Declerck, S. A. J., Decaestecker, E., Muylaert, K. (2014): Longterm allelopathic control of phytoplankton by the submerged macrophyte *Elodea nuttallii*. *Freshwater Biology*, 59(5): 930-41.
- Von Ledebur, M. & Schmid, W. (1973): The Micronucleus Test Methodological Aspects. *Mutation Research*, 19: 109-117.
- Von Proschwitz, T. (2008): The Chinese giant mussel – *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia, *Unionidae*) – an unwelcome addition to the Swedish fauna. *Basteria*, 72: 307-311.
- Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. (2014): Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress. *Hydrobiologia*, 735: 221-231.
- Wadhia, K., & Thompson, K. C. (2007): Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(4): 300-307.
- WDF (2000) – Water Framework Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23. October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities, 1-327. Brussels
- Weber, C. I. (1991): Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, Ohio, United States. Environmental Protection Agency.

- Weisz, M., Polyák, K., Hlavay, J. (2000): Fractionation of elements in sediment samples collected in rivers and harbors at Lake Balaton and its catchment area. *Microchemical Journal*, 67(1-3): 207-217.
- White, P. A. & Rasmussen, J. B. (1998): The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 410: 223-236.
- WHO World Health Organization (2004): WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, pp. 82.
- Woźnicki, P., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E., Bardega, R. (2004): The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to benzo[a]pyrene. *Acta Toxicology*, 12(1): 41-5.
- Wu, M., Mintz, M., Wang, M., Arora, S. (2009): Water consumption in the production of ethanol and petroleum gasoline. *Environmental management*, 44: 981-997. <http://dx.doi.org/10.1007/s00267-009-9370-0>.
- Wu, S., Yassine, M.H., Suidan, M.T., Venosa, A.D. (2015): Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under methanogenic conditions. *Water Research*, 87: 395-402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.024>.
- Xian, Q., Chen, H., Zou, H., Yin, D. (2006): Allelopathic activity of volatile substance from submerged macrophytes on *Microcystin aeruginosa*. *Acta Ecologica Sinica*, 26: 3549-3554.
- Yang, Y. (2013): Life cycle freshwater ecotoxicity, human health cancer, and noncancer impacts of corn ethanol and gasoline in the U.S. *Journal of Cleaner Production*, 53: 149-157.
- Yassine, M.H., Wu, S., Suidan, M.T., Venosa, A.D. (2012): Microtox aquatic toxicity of petrodiesel and biodiesel blends: the role of biodiesel's autoxidation products. *Environmental toxicology and chemistry*, 31: 2757-2762.
- Ye, Y., Weiwei, J., Na, L., Mei, M., Donghong, W., Zijian, W., Kaifeng, R. (2014): Assessing of genotoxicity of 16 centralized source-waters in China by means of the SOS/umu assay and the micronucleus test: initial identification of the potential genotoxicants by use of a GC/MS method and the QSAR Toolbox 3.0 *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 763: 36-43.
- Yildiz, M., Ciğerci, I. H., Konuk, M., Fidan, A. F., Terzi, H. (2009): Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*. 75(7): 934-938.

- Yin, X. H., Zhu, G. N., Li, X. B., Liu, S. J. (2009): Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: *Anura*) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research*, 680: 2-6.
- Zuo, S., Fang, Z., Yang, S., Wan, K., Han, Y. (2015): Effect of allelopathic potential from selected aquatic macrophytes on algal interaction in the polluted water. *Biochemical systematics and ecology*; 61: 133-138.
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D. A. T. (2013): Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*, 93: 201-208.

Értekezés alapját képező tudományos közlemények

Nemzetközi referált folyóiratban megjelent idegen nyelvű publikációk:

- Eck-Varanka, B., Kováts, N., Horváth, E., Ferincz, Á., Kakasi, B., Nagy, Sz. T., Imre, K., Paulovits, G. (2018): Eco-and genotoxicity profiling of a rapeseed biodiesel using a battery of bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151: 170-177. **IF: 3.743**
- Eck-Varanka, B. M., Kováts, N., Paulovits, G., Horváth, E. (2016): Assessment of municipal wastewater genotoxicity using the Ames fluctuation test, the SOS Chromotest and the mussel micronucleus test: a comparison. *International Journal of Environmental Engineering*, 3(1): 135-138.
- Eck-Varanka, B. M., Kováts, N., Hubai, K. E., Paulovits, G., Ferincz, Á., Horváth, E. (2016): Screening potential genotoxic effect of aquatic plant extracts using the mussel micronucleus test. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(1), 36-38.
- Eck-Varanka, B., Kováts, N., Hubai, K., Paulovits, G., Ferincz, Á., Horváth, E. (2015): Genotoxic effect of *Lythrum salicaria* extract determined by the mussel micronucleus test. *Acta Biologica Hungarica*, 66(4): 460-463. **IF:0.589**
- Eck-Varanka, B., Horváth, E., Ferincz, Á., Paulovits, G., Kováts, N. (2014): Comparative assessment of the mussel micronucleus test versus bacterial bioassays for genotoxicity testing of benzo [a] pyrene. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 42(1): 1-5.

Az értekezéshez nem szorosan kapcsolódó tudományos közlemények

Nemzetközi referált folyóiratban megjelent idegen nyelvű publikációk:

Kakasi, B., Horváth, E., Kováts, N., Eck-Varanka, B. M., Paulovits, G. (2016): Geno- and cytotoxicologic assessment of wastewater effluents with mussel micronucleus assay and with flow cytometric sperm toxicity assay: a comparison. *International Journal of Environmental Engineering*, 3(1): 139-142. ISSN 1756-8463

Eck-Varanka, B., Horváth, E., Andreidesz, K., Kováts, N. (2014): Kagyló mikronukleusz teszt és bakteriális tesztek érzékenységének összehasonlítása kommunális szennyvíz genotoxikus hatásának becslésére. *Hidrológiai Közlöny*, 94(1): 65-68.

Konferencia kiadványok:

Eck-Varanka, B., Kováts, N., Paulovits, G., Hubai, K., Ferincz, Á., Horváth, E.: Assessment of allelopathic aquatic plants: evaluating genotoxic effect using the mussel micronucleus test. *CESAMIR – Central European Symposium for Aquatic Invertebrates Research*, Pécs, July 3-8 2016.

Eck-Varanka, B., Kováts, N., Paulovits, G., Horváth, E.: Assessment of municipal wastewater genotoxicity using the Ames fluctuation test, the SOS Chromotest and the mussel micronucleus test: a comparison. *International Conference on Advances in Bio-Informatics and Environmental Engineering: ICABEE Róma, Olaszország, 2015*. december 10-11. pp. 26-29. ISBN:978-1-63248-078-1

Kakasi, B., Horváth, E., Kováts, N., Eck-Varanka, B., Paulovits, G., Nagy, Sz. T.: Geno- and cytotoxicologic assessment of wastewater effluents with mussel micronucleus assay and with flow cytometric sperm toxicity assay: a comparison. *International Conference on Advances in Bio-Informatics and Environmental Engineering: ICABEE Róma, Olaszország, 2015*. december 10-11. pp. 30-33. ISBN:978-1-63248-078-1

Eck-Varanka, B., Horváth, E., Kováts, N., Hubai, K., Paulovits, G., Ferincz, Á.: Vízi növények genotoxikus karakterének vizsgálata kagyló mikronukleusz teszttel. *Magyar Ökológus Kongresszus, Veszprém, 2015* augusztus

Horváth, E., Eck-Varanka, B., Ferincz, Á., Paulovits, G., Kováts, N.: Assessment of a battery of biotests for assessing the genotoxic potential of environmental pollutants. *Lakes: The*

Mirrors of the Earth. Balancing Ecosystem Integrity and Human Wellbeing. 15th World Lake Conference, Perugia, **2014**. 1-6 Sept. Proceedings, pp. 40-43, ISBN: 978-88-96504-04-8 (print)

Kováts, N., Horváth, E., Eck-Varanka, B., Paulovits, G.: *Sinanodonta woodiana* as a good surrogate species in environmental assessment. International Congress for Conservation Biology: ICCB, **2014**. augusztus 2-6. Montpellier, Franciaország, Book of Abstracts pp. 371.

Eck-Varanka, B., Horváth, E., Paulovits, G., Kováts, N.: Környezeti minták genotoxicitásának elemzésére alkalmazott tesztek összevetése. I. Vízkémiai és Technológiai Konferencia és 57. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Veszprém, **2014**. július 7-9.

Köszönetnyilvánítás

Legelőször témavezetőmnek, Dr. Kováts Nórának szeretnék köszönetet mondani mindazért a szakmai támogatásért, amelyet a disszertációhoz nyújtott, valamint a különféle tesztek és módszerek alkalmazásának széleskörű ismereteiért, amelyet részben nekem is átadott.

Külön köszönettel tartozom Dr. Horváth Eszternek, aki sokat segített a gyakorlati munka során, és a kiértékelésnél gyakran mutatott rá más nézőpontra is.

Szeretném kifejezni köszönetemet azoknak a kollégáimnak és a Limnológia Tanszék munkatársainak, akik bármilyen módon hozzájárultak a munkámhoz és a disszertációm megírásához.

Köszönöm az MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet vezetőségének, hogy használhattam az intézmény akváriumszobáját a kagylók tárolásához, valamint, hogy ott végezhettem el a kagyló teszteket.

Végül szeretném megköszönni a férjemnek és a családomnak mindazt az időt és türelmet, amit tőlük kaptam a disszertációm megírásához, és köszönöm a barátaimnak a fokozatszerzési eljárás során nyújtott támogatásukat.

Munkámat a GINOP-2.3.2-15-2016-00017: „Bionanotechnológiai kutatások betegségek hatékony kimutatása, újfajta hatóanyagok kifejlesztése és bioinspirált intelligens nanoanyagok előállítása érdekében” pályázat támogatásával végeztem.