



Szent István Egyetem

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

Hrács Krisztina

Gödöllő
2020

A doktori iskola

megnevezése: SZIE Biológiateadományi Doktori Iskola

tudományága: Biológia tudományok

vezetője: Dr. Nagy Zoltán

egyetemi tanár, DSc

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Növénytani és Ökofiziológiai Intézet

témavezető: Dr. Nagy Péter István

egyetemi docens, PhD

Állattudományi Alapok Intézet

Állattani és Állatökológiai Tanszék

.....
Dr. Nagy Zoltán jóváhagyása

.....
Dr. Nagy Péter István
jóváhagyása

1. Bevezetés

A nanotechnológia jelentősége már az élet számos területén megkérdőjelezhetetlen. Ez a fogalom a nano (10^{-9}) mérettartományba tartozó, tehát legalább egy dimenziójukban 1-100 nm közé eső anyagok alkalmazására vonatkozik. A nanotechnológia célja elsősorban nem teljesen új anyagok vagy készítmények előállítása, hanem a méretből adódó kedvező tulajdonságok kihasználásával a készítmények hatékonyságának növelése. Erre számos példa található a számítástechnikában, gyógyászatban, kozmetikumok előállításakor. Ezen technológiával előállított készítmények már a fogyasztókhoz is eljutottak, gyártásuk az elkövetkező évtizedben rohamosan növekedni fog. Ebből adódóan környezetbe való kikerülésük meggátolhatatlan, viszont hatásuk a környezetre és az élőlényekre még nagyrészt ismeretlen. Mivel a nanotechnológia az egyik leggyorsabban fejlődő terület, egyre inkább a környezettoxikológiai kutatások középpontjába kerül. A nanoanyagok számos jellemző tulajdonságukat jórészt a nagy felület/térfogat arányuknak köszönhetik, emiatt az atomok nagyrésze a felszínhez közel helyezkedik el. A megnövekedett felület kihasználható például a környezetvédelemben, szennyvíztisztításban az ivóvíz hatékonyabb arzénmentesítésére.

Nanorészecskék természetes úton is keletkezhetnek, például erdőtüzek, vulkánkitörések során. Emberi tevékenység útján keletkezhetnek tervezett formában, de nem kívánatos melléktermékként is, például belsőégésű (dízel) motorok működése során, illetve hegesztés, grillezés alkalmával. Cink-oxid (ZnO) nanorészecskék használatosak kerámiák, cement, üveg és számos egyéb termék gyártása során. Hatékony UV fényabszorpciós képességük miatt ZnO nanorészecskéket használnak a fényvédő krémekben és egyéb kozmetikai termékekben is, így a ZnO nanorészecskék megnövekedett mértékű kikerülése a környezetbe fokozott kockázatot jelenthet.

Nanoanyagok szabadon élő fonálférgekre gyakorolt hatásaival kapcsolatos adatok azonban lényegében kizárólag csak egyetlen tesztszervezetre, a Rhabdita rendbe tartozó, bakterivor (baktériumfogyasztó), r-stratégista *Caenorhabditis elegans* fajra vonatkozóan állnak rendelkezésünkre. Korábbi vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy a K-stratégista fonálférgek eltérő taxonómiai pozíciójukból, és ebből eredően egyes eltérő anatómiai tulajdonságaikból is következően valószínűleg sokkal érzékenyebben reagálnak a xenobiotikumokra, mint a Rhabditida rendbe tartozó fonálférgek. A K-stratégista, növényi nedvszívó *Xiphinema vuittenezi* (Penetrantia: Dorylaimida) gazdasági szempontból az egyik legjelentősebb *Xiphinema* faj, mert gyümölcsfák és a szőlő kártevője, különösen Közép- és Kelet-Európában. Sok gazdanövénye van, illetve számos talajtípusban megtalálható. Korábbi vizsgálatok alapján igazolható, hogy megfelelően használható tesztszervezet laboratóriumi körülmények között, akár mortalitási, akár nehézfém felvételi és leadási vizsgálatokban. Terepen gyűjtött talajmintákból kinyert egyedei laboratóriumban hetekig életben tarthatók.

Viszonylag nagy testméreteikből és egyedi biomasszájukból adódóan nehézfém felvételi viszonyaik, és ezek hatásai az állatok elemtartalmára, egyedi szinten is vizsgálhatók totálreflexiós röntgenfluoreszcencia (TXRF) spektrometriával.

A szabadon élő baktériumfogyasztó *Panagrellus redivivus* (Secernentia: Rhabditida) faj régóta használatos különféle biológiai kutatásokban, mint modellszervezet, illetve akváriumi kultúrákban, halivadékok táplálékaként. Ez az r-stratégista fonálféregfaj könnyen tartható laboratóriumi viszonyok között, emiatt használják vízi és talajban végzett toxicitási vizsgálatokban egyaránt. Nagyobb reprodukciós rátájuk miatt, illetve az ellenálló dauer lárvafarmájuk miatt az r-stratégista fonálféreg kevésbé érzékenyen reagálnak a xenobiotikumokra. Azonban kevés adat áll rendelkezésre ZnO hatásairól más életmenet-stratégiájú fonálféregre, például a K-stratégista *X. vuittenezi* fajra. Az eddigiekben már számos publikáció született nano-ZnO *Caenorhabditis elegans*-ra gyakorolt toxikus hatásáról. Ezek a vizsgálatok jelentősen eltérő toxicitási adatokat szolgáltattak, feltehetően a tesztközeg és a módszerek közötti különbségek miatt.

1.1 Célkitűzések

Doktori kutatásaim célja volt, hogy vizsgáljam a nagyszemcsés (bulk), illetve a nano-ZnO toxikus hatását különböző életmenet-stratégiájú szabadon élő fonálféregre. A doktori kutatásom során célul tűztem ki két szabadon élő fonálféreg faj érzékenységének vizsgálatát a cink mérgező hatásával szemben. Ezek egyike a *C. elegans*-hoz hasonló életmódú, korábban szintén elterjedt ökotoxikológiai tesztorganizmusként használt *Panagrellus redivivus*, a másik pedig a növényi nedvszívó, táplálkozásmódja révén növényvédelmi jelentőséggel is bíró, K-stratégista életmenetű *Xiphinema vuittenezi* faj volt.

Kísérleteim három fő irányba összpontosultak:

- i.) egy kereskedelmi forgalomban kapható nano cink-oxid vegyület toxikus hatásainak vizsgálata, annak nagyszemcsés megfelelőjével összehasonlítva. Miután az anyagok karakterizálása során azt tapasztaltuk, hogy a szemcseméret a nano-ZnO esetén sem a nano mérettartományba esik,
- ii.) célzottan előállított nano- és nagyszemcsés ZnO toxikus hatásainak vizsgálatát is célul tűztem ki.
- iii.) fenti eredmények alátámasztása, értelmezése céljából egyes elemek felvételi viszonyainak analitikai vizsgálata a két fonálféreg fajon.

2. Anyag és módszer

2.1 Tesztszervezetek

A kutatás során használt egyik fonálféreg faj a K-stratégista, növényi nedvszívó *Xiphinema vuittenezi* (Luc, Lima, Weischer and Flegg, 1964). A kifejlett nőtény állat hossza a 3,8 mm-t is elérheti, emiatt a szabadon élő fonálféregek között igen nagytestű fajnak számít. A faj többnyire szűznemzéssel szaporodik, a hímek igen ritkák. Sok tápnövényű (polifág) faj, amely főként szőlő és gyümölcsfák gyökérzetét szívogatja.

A kísérletekben felhasznált *X. vuittenezi* egyedek az összes elvégzett vizsgálathoz és kísérlethez azonos helyről származnak. A talajminták egy budapesti ingatlanon található idős Germersdorfi cseresznyefa (*Prunus cerasus* L., cv. 'Germersdorf') gyökérszónájából, 20-40 cm mélységből kerültek begyűjtésre. A fonálféreg kinyerése a talajból Cobb által leírt szitasorozatos módszer egy módosított változata alapján történt. Az ivarérett *X. vuittenezi* nőtények kiválogatása Olympus SZH 10 (Olympus Optical CO., LTD., Tokyo, Japan) preparáló mikroszkóp alatt az alábbi határozó bélyegek alapján történt: fej és fark morfológiája, vulvapozíció.

A szabadon élő, baktériumfogyasztó, r-stratégista *Panagrellus redivivus* (Linné, 1767) faj egyedei leginkább erjedő anyagokban fordulnak elő nagy tömegben. A *Panagrellus redivivus* faj törzstenyésztését gabona alapú táptalajon tartják fent, 20±1 °C hőmérsékletű termosztátban, a SzIE Állattani és Állatökológiai Tanszékén. Az ivarérett nőtények kiválogatása az előző fajhoz hasonló módon történt, Olympus SZH 10 (Olympus Optical CO., LTD., Tokyo, Japan) preparáló mikroszkóp alatt, egy műanyag tű segítségével.

2.2 Kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett toxicitási vizsgálatok

A kereskedelmi forgalomban kapható ZnO részecskéket (Sigma-Aldrich) vizsgáltam. Dr. Sávoly Zoltán mérései alapján megállapítást nyert, hogy a két mérettartományba tartozó ZnO cinkit módosulat alkotja. A nanorészecskék méreteit dinamikus fényszóródással vizsgált azt mutatta, hogy a nano-ZnO esetén a részecskék a vizsgálat körülményei között jellemzően 150 nm és 400 nm közé eső hidrodinamikai átmérővel rendelkeztek. Ezt a mérést a nagyszemcsés cink-oxiddal nem sikerült elvégezni, mert ezt a részecskék mérete nem tette lehetővé. A cinkionok hatásainak vizsgálatához ZnSO₄-ot (Merck Kft., Budapest, Magyarország) használtam.

A tesztek megkezdése előtt a nano- és bulk-ZnO részecskékből egyaránt szuszpenziót készítettem Milli-Q vízben, valamint a ZnSO₄ felhasználásával oldatot készítettem és 30 percig diszpergáltam ultrahangos fürdőben (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany, 37 kHz, 560 W). A *Xiphinema vuittenezi* fajjal végzett toxicitási tesztek 24 lyukú poliészter mikrotitráló lemezen végeztem (IWAKI & CO., LTD., Tokyo, Japan). Minden lyukba 2 ml szuszpenzió, vagy a kontroll esetében Milli-Q víz került. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak a nano- és bulk-ZnO-t tartalmazó szuszpenziók esetén: 5, 25, valamint 50 mg Zn/l. Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztunk. Minden koncentrációt négy ismétlésben állítottam be. A tesztek megkezdésekor 10-10 kifejlett nőstény *Xiphinema vuittenezi* egyedeket helyeztem be lyukanként a mikrotitráló lemez küvettaiba. Az állatok a 168 órás expozíciós idő alatt nem kaptak táplálékot. A mikrotitráló lemezek a kísérlet ideje alatt 20±1 °C hőmérsékleten termosztátban (TS606-CZ/4-WAR; WTW. Weilheim, Germany), sötétben voltak elhelyezve. A toxicitási tesztek végpontja a mortalitás volt. 24, 96, 168 óra expozíciós idő leteltével az elpusztult fonálférgek számát alulról megvilágított látóterű preparáló mikroszkóp alatt határoztam meg. A tartós mozgásképtelenséget a mortalitás jeleként értékeltem. Ennek ellenőrzésére egy műanyag tüvel óvatosan megérintettem az állatokat, lehetőleg a garatideggyűrű környékén, stimuláció céljából. Hogyha ezt követően sem tapasztaltam mozgást, vagy válaszreakciót, az adott példányt elpusztultnak tekintettem.

A kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal *P. redivivus* fajon végzett toxicitási tesztek során használt szuszpenziók, illetve a ZnSO₄-ból készített oldat elkészítése megegyezett a fent leírt módszerrel. Ebben a kísérletben alacsonyabb koncentrációkat választottam. A tesztek 96 lyukú poliészter mikrotitráló lemezen végeztem (IWAKI & CO., LTD., Tokyo, Japan). Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak ZnSO₄ esetén: 1,625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg/l. A bulk- és nano-ZnO esetén: 0,625; 1,25; 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg Zn/l. Az egyes lyukakba 400 µl került, kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. Koncentrációnként öt ismétlést állítottam be, ismétlésenként öt állattal. Az expozíciós idő 24 óra volt, mely alatt az állatok nem kaptak táplálékot. A mikrotitráló lemezeket a kísérlet ideje alatt a fent említett módon termosztátban tartottam. A pusztulás *P. redivivus* esetében egyértelműen megállapítható volt, a tesztek leolvasásakor nem alkalmaztam stimulációt. Az elpusztult egyedek igen jellegzetes egyenes, megnyúlt alakot vettek fel. Az elpusztult egyedek számát feljegyeztem.

2.3 Célzottan előállított cink-oxiddal végzett toxicitási vizsgálatok

A ZnO részecskéket a Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai tanszékén állították elő hidrotermális úton. A mért szemcseméret (±SD) 25,1 ± 9,92 nm volt a nano részecskék esetében és 221 ± 124,25 nm a bulk-ZnO esetében.

A tesztek megkezdése előtt a nano- és bulk-ZnO részecskékből szuszpenziót készítettem Milli-Q vízben és 30 percig diszpergáltam ultrahangos fürdőben (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany, 37 kHz, 560 W). A toxicitási tesztek 24 lyukú poliészter mikrotitráló lemezen (IWAKI & CO., LTD., Tokyo, Japan) végeztem. Minden lyukba 3 ml szuszpenzió került. A tesztekben alkalmazott koncentrációk a következők voltak mindkét részecske esetében: 0,8; 1,75; 2,5; 5; 10; 25; és 50 mg Zn/l. Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. Koncentrációként három ismétlést állítottam be. A tesztek megkezdésekor 10-10 kifejlett nőstény *Xiphinema vuittenezi*, illetve *Panagrellus redivivus* egyed került behelyezésre a mikrotitráló lemez küvettaiba. Az állatok a 24 órás expozíciós idő alatt nem kaptak táplálékot, illetve a mikrotitráló lemezek a kísérlet ideje alatt 20 ± 1 °C hőmérsékleten termosztátban, sötétben voltak elhelyezve. A toxicitási tesztek végpontja a mortalitás volt, amit 24 órás expozíciós idő leteltével ellenőriztem, fentebb a „2.2 Kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett toxicitási vizsgálatok” című részben leírt módon.

2.4 Célzottan előállított cink-oxiddal végzett elemfelvételi vizsgálatok

A nano- és bulk-ZnO szuszpenziók elkészítése a tesztek megkezdése előtt megegyezett a „2.3 Célzottan előállított cink-oxiddal végzett toxicitási vizsgálatok” című részben leírtakkal. Az elemfelvételi vizsgálatok során alkalmazott koncentrációkat a Szegedi Tudományegyetem által előállított cink-oxiddal végzett toxicitási tesztek eredményei alapján határoztam meg. Legalacsonyabb koncentrációnak egy, a toxicitási tesztek során megállapított LC₅₀-nél kisebb koncentrációt választottam, a középső koncentráció az LC₅₀-hez közeli, illetve a legnagyobb koncentrációnak az LC₅₀-nél nagyobb koncentrációt alkalmaztam. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: 1, 5 és 25 mg/l Zn. Kontrollként Milli-Q vizet alkalmaztam. 24 lyukú mikrotitráló lemezbe került a ZnO-ot tartalmazó szuszpenzió, illetve a kontroll, majd 5 véletlenszerűen kiválasztott kifejlett nőstény *X. vuittenezi* vagy *P. redivivus* egyed. Az ilyen módon összeállított tesztek 24 órán keresztül 20 ± 1 °C hőmérsékleten termosztátban sötétben helyeztem el, a toxicitási tesztekkel megegyező módon.

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

A 24 órás inkubációs idő elteltével megkezdtem az állatok testtömeg meghatározásához szükséges fényképek elkészítését. Az állatokat műanyag tú segítségével kiemeltem a kezelő közegből. Annak érdekében, hogy az esetlegesen kívülről a kutikulára tapadt ZnO részecskéket eltávolítsuk, egy percen keresztül tiszta Milli-Q vízben mosást alkalmaztunk. Ez a lépés korábbi vizsgálataink alapján megfelelőnek bizonyult az állatok testére tapadt cinkszennyeződés eltávolítására. Ezt a folyamatot mind a kezelt, mind a kontroll állatokkal megismételtem.

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

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

W: fonálféreg tömege (μg)

L: fonálféreg teljes testhossza (μm)

D: fonálféreg legnagyobb testátmérője (μm)

Fénykép készült az állatok teljes testéről, valamint a legnagyobb testátmérőről, a vulvanyílás közelében. A tömegbecsléshez készült felvételek elkészítése után a fonálférgeket egy műanyag tű segítségével kvarc mintahordozóra helyeztük. Egy mintahordozó lapra egy állat került, lehetőség szerint középre. A lapok egyedi azonosító számmal rendelkeztek. Az állatok roncsolása $5 \mu\text{l}$ cc. suprapur HNO_3 oldattal történt, mely 5 ng gallium belső standardot tartalmazott. Ezt követően a mintákat tartalmazó kvarc mintahordozókat $90 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 10 percig melegítettem üveg Petri-csészére helyezve. Majd az így előkészített minták elemtartalmát ATOMIKA 8030CTXRF spektrométerrel (ATOMIKA Instruments GmbH, Németország) Dr. Sávolgy Zoltán határozta meg a bécsi TU-Wien Atominstitutban. A mérések főbb paraméterei az alábbiak voltak: Mo $\text{K}\alpha$ gerjesztés (50 kV , 47 mA); Zr20 szűrő; 500 s mérési idő.

3. Eredmények

3.1 Kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett toxicitási vizsgálatok

A *Xiphinema vuittenezi* mortalitására irányuló tesztek 24 órás leolvasása alapján a vizsgált tartományban koncentráció-függő mortalitás volt tapasztalható. A nano-ZnO és ZnSO_4 kezeléseknek hasonló volt a mortalitásra gyakorolt hatása. Ezzel szemben a bulk-ZnO kevésbé volt toxikus, a 24 órás expozíció után a mortalitás csupán 20% -os volt a legnagyobb (50 mg Zn/l) alkalmazott koncentráció esetén. A bulk-ZnO mortalitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát folytattam 96 , illetve, 168 órás expozícióig. 96 óra elteltével már a vizsgált legkisebb koncentráció (5 mg/l Zn) is 83% mortalitást eredményezett, 168 óra elteltével pedig minden vizsgált koncentráció esetén 100% volt a mortalitás. A kontrollban, amely Milli-Q víz volt, mind 96 , mind 168 óra után is mindössze 20% volt a mortalitás mértéke.

A másik faj, a *Panagrellus redivivus* esetében nano-ZnO végzett tesztnél a $1,25 \text{ mg Zn/l}$ volt az első koncentráció, ahol szignifikáns ($p < 0,05$) mortalitás-

növekedést regisztráltam a kontrollhoz képest, a bulk-ZnO esetén ez 0,625 mg Zn/l, illetve a ZnSO₄ esetén ez 6,25 mg Zn/l volt.

A kereskedelmi forgalomban kapható nano-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 5,48 mg Zn/l volt. A bulk-ZnO nagyobb toxikus hatást mutatott a vizsgált koncentrációkban. A bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 1,45 mg Zn/l volt. A ZnSO₄ 24 órás LC₅₀ értéke 7,24 mg/l volt.

3.2 Kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett toxicitási vizsgálatok

Koncentráció-függő mortalitást tapasztaltam mindkét fonálféreg fajnál, mind a nano-ZnO, mind pedig a bulk-ZnO alkalmazása esetén, 24 órás expozíciós idő után. A kontrollban mindkét faj esetén 10% alatti volt a pusztulás. A ZnO-nak a növényi táplálkozású *X. vuittenezi* mortalitására gyakorolt toxikus hatását a részecskeméret szignifikánsan befolyásolta (kétutas ANOVA, $F = 247,95$, $p < 0,001$). A nano-ZnO toxikus hatása már 1,75 mg/l koncentrációban is szignifikánsnak bizonyult a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). Már 5 mg Zn/l koncentráció is teljes mértékű (100%-os) mortalitást idézett elő a *X. vuittenezi*-re 24 óra után. A LC₁₀, illetve LC₅₀ értékek 95%-os konfidencia intervallumukkal határoztam meg ToxRat statisztikai programmal. A nano-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 1,63 mg Zn/l volt. Ezzel szemben a bulk-ZnO jelentősen kisebb toxikus hatást mutatott a vizsgált koncentrációkban; 25 mg Zn/l volt az első koncentráció, ahol szignifikáns ($p < 0,05$) mortalitás-növekedést regisztráltunk a kontrollhoz képest. A bulk-ZnO 24 órás LC₅₀ értéke 57,77 mg Zn/l volt.

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

3.3 Célzottan előállított cink-oxiddal végzett elemfelvételi vizsgálatok

A TXRF végzett mérések során vizsgáltam, hogy a ZnO-val való expozíció hatására, hogyan változik az állatok cinktartalma. Emellett mértünk egyéb elemtartalmat is.

Mindkét faj kezeletlen egyedeinek elemtartalmára vonatkozó összefoglaló eredmények a 1. táblázatban láthatók. Az állatok elemtartamára vonatkozó eredményeket (átlag (\pm szórás)) minden esetben olyan módon adtam meg, hogy az adott elem ng-ban kifejezett mennyisége elosztásra került az állat μ g-ban kifejezett testtömegével.

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

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

Cinktartalom

A 2. táblázat bemutatja az állatok testében mért cink mennyiségét. Mindkét faj esetében koncentrációfüggő hatás volt megfigyelhető (többutas ANOVA, $F = 10,47$, $p < 0,001$). A részecskeméret nem befolyásolta az állatokban mért cinktartalmat egyik faj esetében sem. A *X. vuittenezi* fajnál a 25 mg Zn/l koncentrációjú tesztközeg eredményezett szignifikánsan magasabb cinktartalmat a kontrollhoz képest, nano- és bulk-ZnO esetén is. Ezzel szemben a *P. redivivus* esetén már 5 mg/l koncentrációtól szignifikánsan több cink volt mérhető az állatok testében a kontrollhoz képest. A testtömegre számított cinkmennyiség alapján a *P. redivivus* szignifikánsan többet vett fel a cinkből, mint a másik faj (többutas ANOVA, $F = 5,31$, $p = 0,025$).

2. táblázat Fonálférgék cinktartalma

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

Káliumtartalom

Szignifikáns különbség volt a két faj káliumtartalmában (többutas ANOVA, $p < 0,001$; $F = 16,5$). A két faj közül a *X. vuittenezi* kezeletlen példányai szignifikánsan kevesebb káliumot tartalmaztak ($1,94 \pm 0,18$ ng/μg), mint a *P. redivivus* faj kezeletlen egyedei ($3,09 \pm 0,52$ ng/μg). Nem volt szignifikáns eltérés a *X. vuittenezi* faj esetében a kontrollhoz képest sem a nano, sem bulk-ZnO esetén,

kivéve az 1 mg/l nano-ZnO koncentrációval kezelt állatok esetén, amelyek közül a nano-ZnO kezelésben részesült példányok káliumtartalma kisebb volt a többiekénél. Ezzel szemben a másik faj, a *P. redivivus* kezelt egyedeinek káliumtartalma szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest. A szemcseméretnek nem volt szignifikáns hatása az állatok káliumtartalmára.

Kalciumtartalom

Szignifikáns különbség volt a két faj kalciumtartalmában a kontroll és kezelt állatok esetén is. A *P. redivivus* faj kontroll egyedeiben $2,4 \pm 0,97$ ng/ μ g kalcium volt mérhető, ez a másik faj esetén $0,79 \pm 0,09$ ng/ μ g volt. Sem a nano, sem a bulk-ZnO kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a *X. vuittenezi* faj egyedeinek kalciumtartalmára, ezzel szemben *P. redivivus* egyedinek kalciumtartalma a nano-ZnO kezelés hatására csökkent. A szemcseméretnek nem volt szignifikáns hatása az állatok testében mérhető kalcium mennyiségére (ANOVA, $F = 1,26$; $p = 0,27$).

Réztartalom; kéntartalom; vastartalom

Nem volt szignifikáns különbség a kontroll és kezelt állatok réztartalma között. Az összes mért adatot figyelembe véve a két faj réztartalma között szignifikáns volt a különbség ($p < 0,001$, $F = 46,2$).

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

Ezzel szemben sem a fajnak, sem pedig a szemcseméretnek nem volt hatása erre a paraméterre. Hasonló foszfortartalom volt mérhető a két faj esetén.

3.4 Új tudományos eredmények

- A *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg fajjal poliészter mikrotitráló lemezen Milli-Q vizes közegben elvégzett ökotoxikológiai vizsgálat során megállapítottam, hogy a növényi táplálkozású *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg faj jelentősen nagyobb érzékenységet mutat a nano- mint a nagyszemcsés ZnO mérgező hatása iránt.
- A *Xiphinema vuittenezi* és a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajokkal poliészter mikrotitráló lemezen Milli-Q vizes közegben elvégzett ökotoxikológiai vizsgálat során megállapítottam, hogy a fitofág *Xiphinema vuittenezi* és a bakteriális táplálkozású *Panagrellus redivivus* azonos érzékenységet mutat a 25 nm-es méretű nano-ZnO mérgező hatása iránt.
- A vizsgált fonálféreg fajok elemfelvételi viszonyaira, illetve elemtartalmára vonatkozóan megállapítottam, hogy az általam alkalmazott kísérleti körülmények között a *Xiphinema vuittenezi* és a *Panagrellus redivivus* faj kezeletlen egyedei között cinktartalom, vastartalom, foszfortartalom, kéntartalom, réztartalom tekintetében nincs különbség. A *Xiphinema vuittenezi* és a *Panagrellus redivivus* faj kezeletlen egyedei különböztek azonban káliumtartalom, illetve kalciumtartalom tekintetében. Mindkét elem a *Panagrellus redivivus* egyedeiben fordult elő szignifikánsan nagyobb mennyiségben.
- Megállapítottam, hogy a nano- és a nagyszemcsés ZnO expozíció hatására változhat az állatok elemtartalma, amennyiben a cink-oxid kezelés csökkentette a kezelt *Panagrellus redivivus* egyedek kalciumtartalmát, illetve káliumtartalmát.

4. Következtetések és a javaslatok

A kereskedelmi forgalomban kapható cink-oxiddal végzett mortalitási vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a nano-ZnO sokkal toxikusabbnak bizonyult, mint nagyszemcsés megfelelője, ugyanakkor a mortalitás mértéke közel azonos volt a ZnSO₄ oldat mortalitására gyakorolt hatásával. Tehát annak ellenére, hogy a nano-ZnO-ként forgalmazott készítmény tényleges szemcsemérete alapján nem sorolható a nanoanyagok közé, a nagyszemcsés megfelelőjétől eltérő hatásokat gyakorolt a fonálférgekre. A ZnSO₄ oldattal végzett vizsgálatok alapján az anyag toxicitásáért a kioldódott Zn²⁺ ionok a felelősök.

A Szegedi Tudományegyetem által előállított nano-ZnO (~25 nm) és bulk-ZnO (~221 nm) *P. redivivus* mortalitására gyakorolt hatása megegyező volt. Ez az eredmény összhangban van olyan, szakirodalomban fellelhető tesztek eredményeivel, melyek során a *C. elegans* használtak tesztszervezetként. A növényi táplálkozású *X. vuittenezi* számára azonban a nano-ZnO sokkal toxikusabb volt, mint a nagyszemcsés ZnO, ez a különbség az LC₅₀ értékekben is megmutatkozott.

Eredményeink rámutatnak a két faj érzékenysége közti különbségre, amely azonban nem feltétlenül esik egybe az eddigi ismeretek alapján elvárható trendekkel. A *X. vuittenezi* faj a Dorylaimida rendbe tartozik, amelyet általánosságban a leginkább stresszérzékeny csoportként tartanak számon (Bongers, 1990).

A két vizsgált faj kezelt egyedeinek elemtartalma eltérő módon változott a kezelések hatására. A *P. redivivus* faj cinkfelvétele szignifikánsan nagyobb volt, mint a *X. vuittenezi* fajé, valamint az utóbbi faj elemtartalmára összességében kevésbé volt hatással a kezelés. A *X. vuittenezi* fajnál csak a legnagyobb alkalmazott koncentráció (25 mg Zn/l) eredményezett szignifikáns cinktartalom növekedést a kontroll egyedekhez képest. Ezzel szemben a bakterivor *P. redivivus* vizsgálata során már 5 mg Zn/l koncentrációjú kezelés esetén szignifikánsan több cink volt mérhető az állatokban. A szemcseméretnek nem volt szignifikáns hatása a cinkfelvételre egyik faj esetében sem.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a szemcseméretnek van szerepe, amennyiben a különböző életmenet-stratégiájú fonálférgék eltérő módon reagáltak a nanoszemcsés, valamint a nagyszemcsés cink-oxidra.

A kapott eredmények alapján a növényi táplálkozású *Xiphinema vuittenezi* fonálféreg faj jelentősen érzékenyebb a nano- mint a nagyszemcsés ZnO terhelésre. A *P. redivivus* esetén viszont a részecskeméret nem befolyásolta a ZnO mérgező hatása iránti érzékenységét. A két faj érzékenysége azonos mértékűnek tekinthető a vizsgálatban alkalmazott laboratóriumi körülmények között végzett, 25 nm-es méretű nano-ZnO kezelések esetén.

5. Tudományos publikációk

Tudományos folyóiratcikk

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk referált folyóiratokban:

Hrács K., Sávolý Z., Seres A., Kiss L.V., Papp I.Z., Kukovecz Á., Záray G., Nagy P. (2018) Toxicity and uptake of nanoparticulate and bulk ZnO in nematodes with different life strategies.

Ecotoxicology 8:1058-1068.

DOI: 10.1007/s10646-018-1959-8; IF=1,94

Kiss L.V., **Hrács K.**, Nagy P.I., Seres A. (2018) Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on *Panagrellus redivivus* (Nematoda) and *Folsomia candida* (Collembola) in Various Test Media.

International Journal of Environmental Research, 12: 11 p.

DOI: 10.1007/s41742-018-0086-y

Sávolý Z., **Hrács K.**, Pemmer B., Strelí C., Záray Gy., Nagy P.I. (2016) Uptake and toxicity of nano-ZnO in the plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*: the role of dissolved zinc and nanoparticle-specific effects

Environmental Science and Pollution Research 1-10

DOI: 10.1007/s11356-015-5983-4; IF=2,741

Sávolý Z., Buzanich G., Pepponi G., Strelí C., **Hrács K.**, Nagy P.I., Záray G. (2015) The fate of nano-ZnO and its bulk counterpart in the body of microscopic nematodes: An X-ray spectrometric study. **Microchemical Journal** 118:80-87.

DOI: 10.1016/j.microc.2014.08.011; IF=2,893

Kiss L.V., **Hrács K.**, Nagy P. I., Seres A. (2015)

Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztorganizmumokra. **Állattani Közlemények** 100:77-88.

DOI: 10.20331/AllKoz.2015.100.1-2.77

Sávolý Z., Nagy P., Varga G., Havancsák K., **Hrács K.**, Záray G. (2013) A novel method for investigation of uptake and distribution of polluting microelements and nanoparticles in soil-inhabiting nematodes.

Microchemical Journal 110:558-567.

DOI: 10.1016/j.microc.2013.07.007, IF=3,05

Kiss L. V., **Hrács K.**, Nagy P. I., Seres A. (2016)
Nano szemcseméretű fém-oxidok hatásai a talajban élő kiemelt ökológiai jelentőségű mikroorganizmusokra – Szemle.

Agrokémia és Talajtan 65:115-134.

DOI: 10.1556/0088.2016.65.1.8

A disszertáció témájához kapcsolódó ismeretterjesztő publikáció:

Sávoly Z., **Hrács K.** (2015)

Talajszennyezésről áruklódó fonálférgék: Röntgensugárzás az ökotoxikológia szolgálatában

Élet és Tudomány LXX: 272-274.

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

Daragó Á., Szabó M., **Hrács K.**, Takács A. P., Nagy P.I. (2013)

In vitro investigations on the biological control of *Xiphinema index* with *Trichoderma* species. **Helminthologia** 50: 132-137.

DOI: 10.2478/s11687-013-0121-7; IF=0,776

Seres A., **Hrács K.**, Gyurcsó G., Sárospataki M., Szakálas J., Nagy P.I. (2016)
Laboratory studies on the effects of a neonicotinoid-containing seed treatment product on non-target soil animals. **Columella: Journal of Agricultural and Environmental Sciences** 3:7-14.

DOI: 10.18380/SZIE.COLUM.2016.3.2.7

Konferencia kiadványok

Tudományos előadások:

Seres A., **Hrács K.**, Kiss L. V., Posta K., Nagy P. (2015)

Nano- és nagyszemcsés cink-oxid hatásainak vizsgálata talajlakó szervezeteken TOX'2015 Tudományos Konferencia . Konferencia helye, ideje: Harkány, 2015.10.14 -2015.10.16. p. 30. 1 p.

Hrács K., Horváth B. (2013)

Nanoanyagok és nehézfémek ökotoxikológiai vizsgálata szabadon élő fonálférgekkel és az eredmények kiértékelése mikroanalitikai mérésekkel kiegészítve

PhD Hallgatók Környezettudományi Konferenciája, Budapest, 2013.06.06.

Nagy P. Sávoly Z., **Hrács K.**, Horváth B., Záray Gy.
Studies on the copper uptake by the plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*
In: Kakouli Duarte T.(szerk.) 2 nd International Symposium on Nematodes as Environmental Bioindicators. Belgium, Gent 2012.07.05
2012.07.06. Association of Applied Biologists, p. 20.

Hrács K., Nagy P. (2012)
Toxicity of nanosized TiO₂ to plant-feeding nematodes
In: 31st International Symposium of the European Society of Nematologists. Törökország, Adana, 2012.09.23 -2012.09.27. p. 264. 1 p.

Nagy P., Sávoly Z., Havancsák K., **Hrács K.**, Horváth B., Záray Gy. (2012)
Heavy metal effects on nematodes: stress responses and uptake characteristics of *Xiphinema vuittenezi*
In: 31st International Symposium of the European Society of Nematologists. Törökország, Adana, 2012.09.23 -2012.09.27. p. 232.

Hrács K., Van Hoecke K., Janssen C. (2011)
Szilika nanorészecskék és alumíniumborítású szilika nanorészecskék ökotoxikológiai hatásai egy édesvízi egysejtű zöld algára, *Pseudokirchneriella subcapitata*
In: TOX'2011 Tudományos Konferencia, Magyar Toxikológusok Társasága. Sümeg, 2011.10.12 -2011.10.14. p. 36. 1 p.

Hrács K., Gonzalez M.E., Bakonyi G. (2011)
Eltérő formulációjú (mikrokapszulázott, granulátum) növényvédő szerek ökotoxikológiai hatásai ugróvillásokra (Collembola)
Budapest, Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztályának előadói ülése, 2011.03.02

Konferencia poszterek:

Kiss L. V., **Hrács K.**, Nagy P. I., Seres A. (2016)
The toxic effects of different particle sized zinc oxide on terrestrial springtail and nematode test organisms
In: XVII International Colloquium on Soil Zoology (ICSZ): Soil Biodiversity for Our Future Earth – Abstract Book . 160 p.
Japán, Nara 2016.08.22 -2016.08.26. p. 122.

- Kiss L. V., Nagy P. I., **Hrács K.**, Seres A. (2016)
Többféle szemcseméretű cink-oxid és réz toxikus hatásainak vizsgálata szabadon élő fonálféreg tesztszervezeten
In: Fenesi A., László Z., Markó B. (szerk.)
17. Kolozsvári Biológus Napok . 98 p.
Románia, Kolozsvár ,2016.04.08 -2016.04.09. Kolozsvár: Babes-Bolyai Tudományegyetem, p. 44.
- Hrács K.**, Daragó Á., Sávoly Z., Nagy P. (2015)
Egy nanotechnológiával előállított növényvédőszer ökotoxikológiai hatása a *Xiphinema index* tūfonálféreg fajra
In: Horváth J., Haltrich A., Molnár J. (szerk.)
61. Növényvédelmi Tudományos Napok . 107 p.
Budapest, 2015.02.17 -2015.02.18. Budapest: MAE Növényvédelmi Társaság, p. 79.
- Hrács K.**, Sávoly Z., Pemmer B., Sterli C., Záray Gy., Nagy P. (2015)
Nano cink-oxid toxicitásának és felvételi viszonyainak vizsgálata egy szabadon élő növényi táplálkozású fonálféreg fajon, *Xiphinema vuittenezi*
TOX'2015 Tudományos Konferencia. Harkány, 2015.10.14 -2015.10.16. p. 52.
1 p.
- Kiss L. V., Nagy P. I., **Hrács K.**, Seres A. (2015)
Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztszervezetekre
In: Darvas B., Bakonyi G., Biró B., Major J., Mörtl M., Vehovszky Á. (szerk.)
V. : előadás és poszter kötete . 46 p. Ökotoxikológiai Konferencia
Budapest, 2015.11.20 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2015. pp. 16-17. (ISBN:978-963-89452-5-9)
- Hrács K.**, Papp I. Z., Kukovecz Á., Brezina B., Wilk T., Nagy P. (2015)
Nano- és nagyszemcsés cink-oxid ökotoxikológiai hatása két eltérő táplálkozásmódú és életmenetű szabadon élő fonálféreg fajra
In: Padisák J., Liker A., Stenger-Kovács Cs. (szerk.)
X. Magyar Ökológus Kongresszus . 165 p.
Veszprém, 2015.08.12 -2015.08.14. Veszprém: Pannon Egyetem, p. 68. 1 p.
- Hrács K.**, Sávoly Z., Horváth B., Nagy P. (2013)
ZnO nanorészecskék ökotoxikológia és mikroanalitikai vizsgálata szabadon élő talajlakó fonálféregken
In: Tox 2013.: Velence, 2013.10.16 -2013.10.18. Velence: p. 64. 1 p.

Hrács K., Seres A., Nagy P. (2012)

Szabadon élő fonálférgék, mint bioindikátorok – nanoanyagok toxikus hatásai.
In: Egészségtudomány. Hévíz, 2012.10.17 -2012.10.19. pp. 96-97.

Hrács K., Nagy P. (2012)

A méret a lényeg...? ZnO nanorészecskék ökotoxikológiai hatásai egy K-stratégista talajlakó fonálféregre

In: 9. Magyar Ökológus Kongresszus. Keszthely, 2012.09.05 -2012.09.07.
Keszthely: p. 55. 1 p.

Hrács K., Nagy P. (2012)

Preliminary results on toxicity of nanosized and bulk ZnO to a plant-feeding nematode, *Xiphinema vuittenezi*

In: Thomaé Kakouli Duarte (szerk.)

2 nd International Symposium on Nematodes as Environmental Bioindicators.
Belgium, Gent. 2012.07.05 -2012.07.06. Association of Applied Biologists, p. 49. 1 p.

Hrács K., Seres A., Nagy P. (2012)

Szabadon élő fonálférgék, mint bioindikátorok – nanoanyagok toxikus hatásai

In: TOX'2012 Tudományos Konferencia, Magyar toxikológusok társasága.
Hévíz, 2012.10.17 -2012.10.19. p. 64. 1 p.

Sávoly Z., **Hrács K.**, Havancsák K., Nagy P., Záray Gy. (2012)

Talajlakó fonálférgék mikroanalitikai vizsgálata FIB-SEM technika segítségével

In: II. Ökotoxikológiai Konferencia . Konferencia helye, ideje:

Budapest,2012.11.23 p. 23. 1 p.