

KÖRNYEZETTUDOMÁNY

A NYME SAVARIA EGYETEMI KÖZPONT
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEI XXI.
TERMÉSZETTUDOMÁNYOK 16.

Szombathely, 2016. pp. 121-134.

FARSANG ÁGOTA ¹, BÉRES CSILLA ², RÉTFALVI TAMÁS ³

VIBRIO FISCHERI TESZTSZERVEZET ALKALMAZÁSA AZ ÖKOTOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATOKBAN

Abstract: Evaluation of biological effects using a rapid, sensitive and cost effective method can indicate specific information on toxicity/ecotoxicity. Since assays based on animals, plants and algae are expensive, time consuming and require large sample volume, recent studies have emphasized the benefits of rapid, reproducible and cost effective bacterial assays for toxicity screening and assessment. This review focuses on a bacterial assay, i.e., Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay, which is often chosen as the first test in a test battery based on speed and cost consideration. Researchers have reported the Vibrio fischeri bioluminescence assay as the most sensitive across a wide range of chemicals compared. This assay shows good correlations with other standard acute toxicity assays and is reported to detect toxicity across a wide spectrum of toxicants.

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben az ipar és mezőgazdaság intenzív fejlődése, valamint a fejlett országok fogyasztói társadalma révén a környezetünkbe kerülő xenobiotikumok mennyisége jelentősen megnövekedett. A vegyi anyagok az ökoszisztémára és ezen keresztül az emberre is veszélyt jelentenek. A környezeti kockázatok reális megítéléséhez és a szükséges intézkedések megtételéhez ökotoxikológiai vizsgálatok elvégzése szükséges. A hagyományos akut ökotoxikológiai teszteknel a nagy mintamennyiség és a hosszú expozíciós idő sok esetben problémát okozhat egy környezetszennyezés gyors feltárásánál. A *Vibrio fischeri* biolumineszcencia gátláson alapuló teszt legnagyobb előnye a gyorsaságában rejlik. A legtöbb készüléknek még terepi mérésre alkalmas fejlesztése is van, ezért akár a szennyezés helyszínén, pár ml mintatérfogatból, egy órán belül eredményt kaphatunk a valós kockázatról. A bakteriális bioszenzornak ily módon mindenképpen helye van a szűrővizsgálatokban és a monitoring

¹ NYME, Savaria Egyetemi Központ, Természettudományi és Műszaki Kar
Földrajz és Környezettudományi Intézet, 9700 Szombathely, Károlyi G. tér 4. E-mail: farsang.agi@nyme.hu

² NYME, Savaria Egyetemi Központ, Természettudományi és Műszaki Kar
Földrajz és Környezettudományi Intézet, 9700 Szombathely, Károlyi G. tér 4. E-mail: beres.csilla@nyme.hu

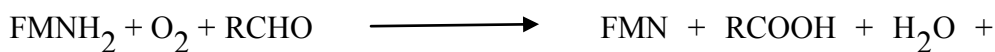
³ NYME, Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar
Kémiai Intézet, 9400 Sopron, Bajcsy-Zsilinszky E. u. 4. E-mail: retfalvi.tamas@nyme.hu

rendszerekben. Hatalmas adatbázis áll rendelkezésre különféle szerves és szervetlen szennyezőanyagokra illetve ezek keverékeire mutatott hatására. A szakirodalmi adatok alapján a legtöbb környezeti kockázatot jelentő szennyezőre érzékenységet mutat. A mérések jól reprodukálhatóak, a hatás kiértékelése nem szubjektív megfigyelésen, hanem objektív fizikai mennyiség mérésen alapul. Elsősorban a szennyvizek minősítésére dolgozták ki, de a vízmintákon túl a tudományos kutatások szerint jól használható üledék, talaj és aeroszol minták esetén is. Fontos szempont alkalmazása során, hogy a baktériumok tesztorganizettként való alkalmazása nem okoz etikai problémákat. Az Európai Unió fokozott figyelmet fordít az állatokkal végzett tesztek számának csökkentésére, ill. alternatív tesztek kidolgozására. Ezen célok az Európai Unió vegyi anyagokkal kapcsolatos stratégiájában (*WHITE PAPER, EUROPEAN COMMISSION* 2001) kerültek megfogalmazásra (*KOVÁTS et al.* 2007). A tanulmány célja, hogy áttekintést kapjunk a *Vibrio Fischeri* baktériummal folytatott kutatások jelenlegi helyzetéről.

2. *Vibrio fischeri* lumineszcens baktérium

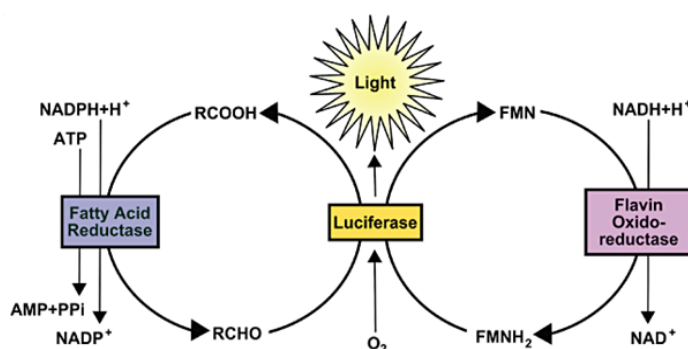
A *Vibrio fischeri* Gram-negatív, anaerob, mélytengeri baktérium. A szabvány és a szakirodalom jelentős része is ezen a néven említi, ritkábban használt elnevezése az új rendszertani besorolás szerint kapott *Aliivibrio fischeri* (*URBANCZYK et al.* 2007). A biolumineszcencia a kemilumineszcencia speciális esete, biokémiai folyamat eredménye, a sejt általános életképességének, kondíciójának a jellemzője. A biolumineszcencia keltésében és szabályozásában speciális enzimfehérjék, az úgynevezett LuxR–LuxI kvórum szenzor rendszer játszik szerepet (*MIYASHIRO & RUBY* 2012). A folyamatok a világítósejtek citoplazmájában lévő, kifejezetten e célra szakosodott sejt szervecskékben, a luciferint, luciferázt és ATP-t tartalmazó peroxiszómákban mennek végbe. A fotogenáz fehérje-vegyületekből a luciferin nevű anyagot termeli a világító szervezetben vagy szervezetekben. A luciferin oxigén jelenlétében luciferáz hatására oxiluciferinné oxidálódik, s közben fényt bocsát ki magából. Az oxiluciferin amilyen könnyen oxidálódott, ugyanolyan könnyen redukálható is luciferinné. A luciferin oxidációjakor az összes energia 92%-a fényenergia alakjában hagyja el a fénykeltő szervet (*1. ábra*). A fénykibocsátás 450-490 nm (kék-zöld) hullámhosszon történik. A luciferáz az oxidációhoz a fényszervben található hidrogén-peroxid oxigénjét használja fel.

A fény képzésének alapegyenlete:



ahol, FMNH_2 a redukált, míg a FMN az oxidált flavin mononukleotid.

A flavin-mononukleotid koenzim izoalloxazin gyűrűje a két hidrogént leadva oxidálódik, csakúgy, mint az aldehid, amely karbonsavvá alakul. (KERESZTÉNYI 2008).



1. ábra: *Vibrio fischeri* fénytermelő folyamata (MIYASHIRO & RUBY 2012)

A *Vibrio fischeri* lux génjét más mikroorganizmusokba is be lehet ültetni, például az *Escherichia coli*-ba, és az addig fénykibocsátásra képtelen *Escherichia coli* baktériumok zöldeskék fénnel fognak világítani a sötétben. Ez azért lehet fontos, mert a fénykibocsátás könnyen mérhető végpont, ami megkönnyítheti a mikroorganizmusok jelenlétének kimutatását és nyomon követését.

3. Biolumineszcencia-gátlási teszt

A mérgező anyag változásokat idéz elő a sejt állapotában – sejtfal, sejtmembrán, elektrontranszport-rendszer, enzimek, citoplazma alkotói – amelyek a biolumineszcencia csökkenésében mutatkoznak meg, ami megfelelően kialakított fotométerrel (luminométer) mérhető. A toxikus hatás és a fénykibocsátás csökkenése arányosak egymással. A szennyező anyagok kémiai szerkezetüktől, illetve tulajdonságaiktól függően többféle úton gátolhatják a peroxidáz enzim és szubsztrátja közötti reakciót: közvetlen reakció a szubsztráttal, az enzim térszerkezetének megváltoztatásával vagy reakciócentrumának tönkretételével (KERESZTÉNYI 2008).

A biolumineszcencia-gátlás mérésére több eszközt is kifejlesztettek, ilyen a Merck ToxAlert készüléksaládja, az Azur Microtox és Deltatox rendszere. Mindkét típusnál van terepi és laboratóriumi mérésekre tervezett készülék is. További műszerek még a német LumisTox, a finn BioToxTM.

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi, bakteriális, akut toxicitási teszt. A végpont a lumineszcencia intenzitásának csökkenése, amely a minta hígítási sorából EC20 (ED20) és EC50 (ED50) értékben határozható meg. A vizsgálat ideje rövid, általában 45 perc és másfél óra között változik a kontaktidőtől függően. A luminométer 490 nm emissziós hullámhosszon működik. A mérést az alábbi magyar szabvány írja le: MSZ EN ISO 11348-2:2000 (Vízminőség. Vízminták gátló hatásának meghatározása a *Vibrio fischeri* fénykibocsátására (lumineszcensbaktérium-teszt). 2. rész: Vizsgálat folyadékból szárított baktériumokkal) és ISO/EN/DIN 11348-3:2000 (Vízminőség. Vízminták gátló hatásának meghatározása a *Vibrio fischeri* fénykibocsátására (lumineszcens baktérium-teszt). 3. rész: Vizsgálat fagyasztva szárított baktériumokkal). A *Vibrio fischeri* folyadékból szárított, vagy fagyasztva szárított állapotban tárolható (-20 ±2°C), eltarthatósági ideje 12 hónap. Tengeri baktérium, ezért a kísérletek végrehajtásakor minimum 2 % NaCl koncentráció fenntartása, az ozmózis nyomás érdekében szükséges. A vizsgálni kívánt mintákat is ilyen sókoncentrációval mérjük. Hidrofób típusú anyagok esetén oldószerként használnak metanolt, etanolt esetleg acetonitrilt. Ebben az esetben is szükséges a 2% NaCl koncentráció fenntartása (PARVEZ *et al.* 2006).

4. A *Vibrio fischeri* érzékenysége különféle szennyezőanyagokra

Számos kutató foglalkozott azzal, hogy a *Vibrio fischeri* tesztszervezetek megbízhatóságát a hagyományos ökotoxikológiai tesztekhez (Daphnia-teszt és a haltesztek) viszonyítva értékelje, illetve számszerűsítse azok érzékenységét különböző vegyületekre.

***Vibrio fischeri* érzékenysége szerves szennyezőkre**

FULLADOSA és társai (2005) modellkísérleteket végeztek, ahol különböző fémvegyületek meghatározott koncentrációjú oldatait párosították össze és mérték a toxikus hatást MicroTox készüléken, pH=6 értéknél. Matematikai modellek segítségével 15 perces expozíciós idővel EC50 értékeket határoztak meg a vizsgált fémekre, majd fém párokra. A különféle fém párok között egyaránt találtak antagonizmust, szinergizmust és additív hatást is. Szinergizmust tapasztaltak a Co-Cu és Zn-Pb fémek esetén,

antagonizmust Co-Cd, Cd-Zn, Cd-Pb és Cu-Pb fém párok között, egyszerű additív hatás lépett fel Co(II)-Pb(II), Cu(II)-Cd(II), Cu(II)-Zn(II), Co(II)-Zn(II) összetevőknél. További kísérletekben (FULLADOSA *et al.* 2005a) fémek és az arzén mérhető küszöbérték toxicitását (EC20) határozták meg változó pH értékek (pH 6 illetve 7) mellett. Tapasztalataik szerint a fémek toxicitása az alábbi sorrendben csökken: Pb(II) > Ag(I) > Hg(II) \approx Cu(II) > Zn(II) > As(V) > Cd(II) \approx Co(II) > As(III) > Cr(VI). A változó pH értékek mellett a Cr(VI) és az As(V) esetén nagyságrendben eltérő EC20 értékeket mértek. Meglepően alacsonynak találták a *Vibrio fischeri* Co(II), Cd(II), Cr(VI), As(V) szembeni érzékenységét. A Gram-negatív baktériumok alacsony kadmium érzékenységét már vizsgálták. BAUDA & BLOCK (1990) kimutatta, hogy a baktérium külső membránja képes adszorbeálni és ezáltal csapdába ejteni a kadmiumot. Az ólom, higany és ezüst erős toxikus hatását a tiol (-SH) csoport felé irányuló nagymértékű affinitással magyarázták. A réz és cink-ionok pedig jól ismert baktericid és antimikrobiális természetű anyagok, amelyek jelentősen befolyásolják a baktériumok enzimátikus rendszerét.

HEINLAAN és társai (2008) ZnO, TiO₂ és CuO normál és nano méretű szuszpenzióját valamint az adott fémionok oldott formájának toxicitását vizsgálták három tesztszervezettel (*Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* és *Thamnocephalus platyurus*). A nanorészecskék alkalmazása növekvő tendenciát mutat, felhasználják fogápolási szerekben, kozmetikai szerekben (pl.: naptejek), fakonzerváló anyagokban stb. Fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaik jelentősen eltérnek az adott fémhez képest. Toxicitásuk fő mechanizmusa az oxidatív stresszen alapul, károsítva a lipideket, szénhidrátokat, fehérjéket és a DNS-t. A lipid peroxidáció veszélyes leginkább, mert változásokat okoz a sejtmembránban, így zavarja a létfontosságú sejtfunkciókat. A kinetikus toxicitást Ascent luminométeren mérték, a rákfélék tesztelése Daphtoxkit FTM magna és Thamnotoxkit FTM tesztkitekkel történt. A titán formák csak 20g/l felett voltak toxikusak mindhárom teszt esetében. A cink minden formában erősen toxikus volt. A rézoxid enyhe-, a nano méretű rézoxid közepes-, az oldott réz erős toxicitást mutatott. A legérzékenyebb tesztszervezetnek a *Thamnocephalus platyurus* bizonyult, ezt követte a *Vibrio fischeri* majd a *Daphnia magna*.

ABBONDANZI és társai (2005) nehézfémekre vizsgálták a *Vibrio fischeri* biolumineszcencia gátlás és a *Pseudomonas fluorescens* dehidrogenáz enzimaktivitás gátlás teszteket. Zn(II) Ni(II), Cd(II), Cu(II) oldatokat teszteltek. A *Pseudomonas fluorescens* baktériummal szerették volna kiváltani a *Vibrio fischeri* tesztet, mivel ennél a tesztnél az optimalizált pH és sótartalom nem változtatja meg a minta toxikus

tulajdonságát. Az eredmények alapján helyettesíthető a két tesztszervezet szerves szennyezőt tartalmazó minták esetén. A cink és réz esetén a *Vibrio fischeri* volt az érzékenyebb, kadmium esetén pedig a *Pseudomonas fluorescens*. A *Vibrio fischeri* alacsony kadmium érzékenységének okát *Bauda & Block* (1990) tárgyalta. A szerves szennyezők mellett fenolra is vizsgálták a baktériumok érzékenységét. A szerves fenolra a *Vibrio fischeri* mutatott nagyobb toxikus hatást.

Vibrio fischeri érzékenysége szerves szennyezőkre

KAISER (1998) teszteredményeket dolgozott fel statisztikailag, keresve a kapcsolatot a *Vibrio fischeri* és vízi-, illetve szárazföldi tesztszervezetek toxicitási értékei között adott vegyületekre. Összehasonlította a 96 órás LC50 tűzcselelénél (*Pimephales promelas*) kapott értékeket a *Vibrio fischeri* EC50 toxicitásos teszttel eredményeivel. A vizsgált szerves vegyületek száma több száz volt (pl.: etilanilin, olajsav, Terbufos, DDT, Dieldrin, Aldicarb stb.). Bár az értékek helyenként tíz nagyságrendbeli eltérést is mutatnak, ennek ellenére a kapott adatok között szoros az összefüggés. További halfajokra és egyéb vízi élőlényekre (algák, rákfélék) is elvégezte a számításokat és hasonló eredményre jutott. A szerves vegyületek funkcionális csoportonként hasonló kémiai tulajdonságokat mutatnak, ami valószínűsíti a hasonló toxikus hatást is. Külön-külön vizsgálva az alkoholok, fenolok, ketonok, és más aromások esetén a két tesztszervezet (*Pimephales promelas* és *Vibrio fischeri*) azonos típusú vegyületekre mutatott toxikus hatása szoros korrelációt mutatott. Szárazföldi emlősökkel végzett kísérletek esetén a kapcsolat jóval gyengébb volt, és az expozíciós utak között jelentős eltérést mutatkozott a korrelációban. A legszorosabb összefüggés az intravénás kísérletek esetén mutatkozott. Kutatása alapján a *Vibrio fischeri* tesztszervezetet kiváló segítségnek tartja gyors, akut toxikus hatások feltérképezésére, különféle vegyületek vagy vegyületcsoportok esetén. A teszt jól használható vízi környezetet érő káros hatások kimutatására.

VILLA és társai (2014) a triklozán, triklokarban és ezek metabolitjának a metil-triklozának toxikusságát vizsgálták MicroTox készüléken. Mindhárom lipofil típusú, aromás klórozott vegyület. Fertőtlenítő-, gomba- és baktériumölő szerként használják elsősorban a kozmetikai szerekben és egyéb eszközökben is, mint sportfelszerelés, bútorok, textíliák stb. A szennyvíztisztítás során csak kis mértékben bomlanak le, így megjelennek a felszíni vizekben, felhalmozódnak a vízi élőlényekben, és az anyatejben is kimutathatóak. A vizsgálat során 15 perces kontaktidővel határozták meg a vegyületek és keverékek EC10 és EC50 értékeit. A triklozán baktériumra

mutatott toxicitása más vízi élőlényekkel azonos nagyságrendű a szakirodalmi adatok alapján. A metil-triklozán metabolit már enyhébb toxicitást mutat, amely eredmény egybevág egyéb vízi élőlények által mért toxicitási értékekkel. Ennek ellentmond *FARRE és társai* (2008) munkája, melyben a metabolit azonos toxicitású az anyatermékkel. A triklokarbán toxicitása közel azonos mértékű volt a triklozánnal. A keverékek toxicitása a modellek által megjósolt értéket mutatta. Mindhárom molekula aromás és lipofil tulajdonságú, így a hatásmechanizmusuk is hasonló, ezáltal jól követik a modellek által jósolt értéket.

Karbamid alapú herbicidek (Linuron, Diuron, Monolinuron) toxicitását vizsgálták *GATIDOU és társai* (2015) békalencse (*Lemna minor*) és *Vibrio fischeri* tesztorganizmokkal 7 napos illetve 30 perces kontaktidővel. A mérést külön-külön és kétkomponensű keverékekben is elvégezték. A növényvédőszeret a mezőgazdaság széles körben, nagy mennyiségben használja. Permetezéskor, illetve eső esetén lombotatról való lemosódással bekerülnek a felszíni vizekbe, így az európai folyókban már kimutathatóak. A Diuron és a Linuron antiösztrogén hatású szerek, gátolják az ovulációt, melyet egyértelműen igazoltak in vivo és in vitro vizsgálatokban is. A vizsgálatok alapján a fotoszintetikus organizmus sokkal érzékenyebbnek bizonyult a növényvédőszerre, mint a baktériumteszt. A Diuron és Linuron toxicitása közel azonos nagyságrendű mindkét tesztorganizmra. A Monolinuront a békalencse kevésbé találta mérgezőnek az előző két herbicidhez képest. A kétkomponensű vizsgálatoknál a Diuron és Linuront tartalmazó mintákban a *Lemna minor* additív hatást mutatott. A *Vibrio fischeri* mindkét vegyület alacsony koncentrációjánál antagonizmust, magas koncentráció esetén additív hatást, alacsony Linuron és magas Diuron koncentrációnál viszont szinergizmust mutatott ki. A Linuron és Monolinuron együtt antagonistá hatásának bizonyult mindkét tesztorganizm esetében. A Diuron Monolinuron párosnál szinergikus és additív hatásokat egyaránt megfigyeltek a változó koncentrációk függvényében a mikrobioteszt esetén.

CZECH és társai (2014) gyógyszerek hatóanyagait kezelték fotooxidációs eljárással, majd mérték a toxicitást kezelés előtt és után *Vibrio fischeri* (15 perc) és *Daphnia magna* (24 és 48 h) tesztorganizmokkal. A vizsgált gyógyszerek: a klóramfenikol (CPL), egy szintetikus antibiotikum, a diklofenák (DCF), egy nem szteroid gyulladáscsökkentő és a metoprolol (MT), egy szelektív béta-receptor blokkoló voltak. A kísérletekben a *Daphnia magna* mutatott nagyobb érzékenységet a vegyületekre. Mindkét tesztorganizmra a CPL volt a legtoxikusabb gyógyszer. A toxicitás csökkenése *Daphnia magna* esetén: CPL>DCF>MT, *Vibrio Fischehri* esetén

CPL>MT>DCF módon változott. A fotooxidációs kezelés hatására jelentős toxicitás csökkenést tapasztaltak. A kezelés után a CPL és MT vegyületeknél mindkét tesztszervezet már csak közepesen toxikusnak találta a mintát. A DCL-t tartalmazó mintát kezelés után a *Daphnia magna* változatlan hatásúnak mutatta, a *Vibrio fischeri* pedig a bomló terméket (EC₅₀=10 mg/l) toxikusabbnak tartotta a kiindulási termékénél (EC₅₀=14mg/l). A kezelés után 60 nappal a toxicitás már jelentősen lecsökkent.

FERNANDEZ-ALBA és társai (2000) karbofurán (inszekticid), kiromazin (inszekticid), fenamifosz (inszekticid), formetanát (inszekticid) és propamokarb (fungicid) toxicitását mérték *Vibrio fischeri* (BioTox), *Daphnia magna* (Daphtoxkit FTMmagna) és mitokondriális enzimaktivitás gátlási (MitoScan) teszttel. A baktériumteszt nem mutatott toxikus hatást a kiromazinra. A többi növényvédőszerre növekvő toxicitási sorrendben így reagált: fenamifosz < karbofurán < propamokarb < formetanát. 5- és 15 perces kontaktidővel dolgozva EC₂₀, EC₅₀ és EC₈₀ értékek kerültek meghatározásra. Általánosságban elmondható, hogy 5 percnél kisebb volt a toxikus hatás. A *Daphnia magna* és a *Vibrio fischeri* eredményei egybevágóak, és a mérgező hatás ebben az esetben is nagyobb volt a 48 órás tesztnél, mint a 24 órásnál. A *Daphnia magna* bizonyult a legérzékenyebb tesztszervezetnek, a baktériumteszt és a mitokondriális enzimgátlás teszt közel azonos nagyságrendű toxicitást detektált. A növényvédőszerkeverésekre egyaránt mérték antagonist, additív és szinergista hatást. Ez alapján javaslatokat tettek a tisztított szennyvíz kibocsátási paramétereinek változtatására. Az új értékek megállapításánál a szinergizmust nem szabad figyelmen kívül hagyni. Az antagonist hatást nézetük szerint mellőzni kell, a komplex összetételű rendszer ismeretlen hatásai miatt. Az alacsonyabb érzékenységet a MitoScan és BioTox rendszereknek kompenzálja a gyors és egyszerű használat, valamint a terepi mérésre is alkalmas eszközeik. Előszűrésre megfelelő tesztnek tartják ezeket.

Három kereskedelmi forgalomba hozott luminométerrel (ToxAlert 100, a MicroTox 500, LumiStox) 81 szerves szennyező anyagon végezték el a tesztelést. Referenciának cink-szulfát oldatot (ZnSO₄*7H₂O) használtak. A hatásos koncentrációk 20, 50 és 80%-os fénykibocsátás gátlásra lettek megállapítva, 5, 15 és 30 perces kontaktidővel. A mérésnél ügyeltek a megfelelő beállított pH és ozmózis egyensúlyra. A különböző készülékeken végzett mérések között két eltérés merült fel. A ToxAlert készüléken egy minta hígítási sorából egy méréssorozat készül, a másik két készüléken kettő. A LumiStox műszeren folyadékban fagyasztott baktériumokkal végezték el a mérést, a másik két luminométeren fagyasztva szárított

baktériumokat ír elő a protokoll. Az eredmények alapján elmondható, hogy a ToxAlert és a MicroTox készülékek közötti adatsor szorosan korrelált, míg a LumiStox és a másik két készülék adatsora között gyengébb volt a kapcsolat. Az eredmények a három módszer esetén nagyságrendileg megegyeztek, 5 vegyület esetén kaptak csak lényegesen eltérő toxicitási adatot. A nagyszámú elvégzett mérés alapján, a baktériumteszttel különböző rendszereken végzett vizsgálatok összehasonlíthatóságát kiválóan találták (JENNINGS *et al.* 2001).

KOVÁTS *és társai* (2007) vizsgálták, hogy a *Vibrio fischeri* baktérium milyen mértékben alkalmas cianobakteriális toxicitás környezeti kockázatának becslésére, és ezáltal az egértesztek helyettesítésére. Az egereken végzett akut intraperitoneális teszt (tesztanyag bejuttatása hasüregbe, injekciózással) egyrészt etikai problémát okoz, ráadásul nem is reprezentálja megfelelően a természetes expozíciós utat. Ezek a toxinok jelentős környezetegészségügyi kockázatot jelentenek. A Kis-Balaton Vízügyi Rendszeren megjelenő kékalga-virágzásokban a *Mycrocystis aeruginosa* fajnak van legnagyobb szerepe. Ez a faj több toxikus vegyületet is termel, közülük a mikrocisztin a legmérgezőbb hatású. A négy különböző kékalga-tartalmú mintánál megfelelő korrelációt találtak a toxin mennyiségével. A teszt eredményei jól korreláltak a *Thamnocephalus platyurus* tesztorganizmus eredményeivel. A teszt gyors és érzékeny a minták össztoxin tartalmára, ezért megfelelőnek tartják a környezeti kockázat becslésére.

Vibrio fischeri érzékenysége komplex, több szennyezőt tartalmazó mintákra

DALZELL *és társai* (2002) 16 ipari szennyvízmintát vettek az alábbi iparágakat érintve: üveg, elektronika, gyógyszer, autó, papír, hulladékfeldolgozás, kőszénkátrány lepárlás. Két standard keveréket állítottak össze modellezésül, és mérték az összetevők valamint a referencia-oldatok toxicitását is. Az első referencia oldat Cd, Cu, Cr, Zn és alkil-benzol-szulfonát volt, a második referencia oldat 3,5-diklórfenolt, triklóretilént, toluolt és alkil-benzol-szulfonátot tartalmazott (East of Scotland Water Authority által ajánlott releváns szennyező anyag koncentrációk eleveniszapos környezetben). A toxicitást az alábbi tesztelésekkel mérték: nitrifikáció gátlás, respirometria, *in vivo* L-alanin-amino-peptidáz gátlás, *Vibrio fischeri* biolumineszcencia gátlás. A szerves szennyezőkre és a referencia oldatra szinte minden tesztorganizmus reagált. A toluolra csak kis mértékben adott választ az enzimgátlási teszt és az iszap légzésgátlási teszt. A tesztek rangsorolták a referenciaoldatokra mutatott érzékenység szerint,

és a vizsgálatok alapján a *Vibrio fischeri* volt a legérzékenyebb (túlérzékeny) teszt. Az ipari szennyvizekre a *Vibrio fischeri* teszt reagált legjobban. A szennyvízre legkevésbé érzékenynek a nitrifikáció és enzimgátló teszt bizonyult. Összességében a *Vibrio fischeri* tesztet gyors szűrővizsgálatra javasolják nagyszámú minta esetén. A költségek összehasonlítása kapcsán elmondható, hogy a nitrifikáció teszt a legalacsonyabb beruházási, de legmagasabb működtetési költségű. A *Vibrio fischeri* teszt mérsékelt beruházási és üzemelési költséggel bír.

Kínai gyógyszergyárak szennyvizének toxikusságát mérték alga (*Scenedesmus obliquus*) és *Vibrio fischeri* tesztorganizmussal. Kínában 2011-ben 2.890.000 t gyógyszert állítottak elő. A gyógyszergyári szennyvizek gyakran tartalmaznak erősen mérgező vegyületeket (pl.: benzol, policiklusos aromás szénhidrogének, heterociklusos vegyületek stb.), melyek biológiailag nehezen bonthatók. 16 gyógyszergyár befolyó és elfolyó szennyvizét vizsgálták. Az ökotoxikológiai vizsgálatokkal párhuzamosan az alábbi fizikai, kémiai paramétereket mérték: pH, teljes lebegőanyag, kémiai oxigénigény (KOI), ammónia (NH₃-N), és teljes foszfor. A befolyó szennyvíz minden esetben toxikusabb volt, mint az elfolyó tisztított szennyvíz. A kezelés ellenére a 16 gyárból azonban 10-nek még mindig túllépte az akut toxicitása a kínai határértéket. A tesztszervezetek közül a *Vibrio fischeri* volt az érzékenyebb. A toxicitás jól korrelált a KOI és NH₃-N értékeivel. Egyértelműen javasolják az eredményeik után a *Vibrio fischeri* használatát gyógyszeripari szennyvizek tisztítás utáni ellenőrzésére (YU et al. 2014).

Spanyolországban négy folyó és két kommunális szennyvíztisztító elfolyó vizének toxicitását vizsgálták *Vibrio fischeri* baktériummal MicroTox és ToxAlert készüléken. Emellett analitikai vizsgálatokkal keresték a vény nélkül kapható fájdalomcsillapító gyógyszereket a mintákban HRGC-MS és LC-ESI-MS készülékeken. A vizsgált hatóanyagok az ibuprofen, diklofenák-Na, szalicilsav, ketoprofén, naproxén, gemfibrozil voltak. Meghatározták a keresett gyógyszerek EC50 értékeit is a mikrobiotesztekkel. A fejlett országokban a népesség előregedésével a gyógyszerhasználat folyamatosan növekszik, a gyógyszerészarmazékok illetve hormonszármazékok a kiválasztás révén megjelennek a szennyvizekben. A nehezen bomló gyógyszerek sok esetben csak áthaladnak a telepen és akadálytalanul elérik a felszíni és felszín alatti vizeket. Az elvégzett ökotoxikológiai vizsgálatok alapján a gyógyszerek 10-50 µg/l koncentráció-tartományába helyezte az 50%-os fénykibocsátás csökkenést. Összehasonlítva a hagyományos gázkromatográfiás és az új folyadék-kromatográfiás elemzések eredményeit megállapították, hogy azok

megfelelően korrelálnak. A kimutatott gyógyszerek a mintákban 20-2000 ng/l koncentrációban mozogtak, egy nagyságrenddel alatta maradtak a határos ökotoxikológiai koncentráció értéknek. Legnagyobb mennyiségben a gyógyszereket a szennyvizekben és a Riera de Rubi folyóban találták. A fénykibocsátás gátlás (ToxAlert) is ezekben a mintákban volt a legmagasabb mértékű. A telepek működését ennek ellenére jónak tartják a szerzők. A legtöbb poláros szerves szennyezőanyag a biológiai kezelés során eltávolításra kerül. A visszamaradt illetve átalakult termékek az egyenesláncú alkil-benzol-szulfonátok (LAS), nonilfenol, polietoxilezett nonilfenol-karboxilát, rövid szénláncú nonilfenol-etoxilát, amelyek mind a mosószerekből származnak. A nonilfenol-etoxilát bomlásterméke a nonilfenol, mely már jóval perzisztensebb az anyaterméknél és a szervezetbe kerülve ösztrogén hatású (xenoösztrogén anyag) (Farré et al. 2008). A vizsgált mintákban a gyógyszerek és mosószerek azok bomlástermékei, valamint ismeretlen eredetű szennyezőanyagok és a közöttük fennálló szinergikus hatások együtt képezik a teljes toxicitást. Az ökotoxikológiai vizsgálatokat célszerű teljes analitikai vizsgálatokkal is összevetve elemezni, hogy ezáltal átfogóbb képet kapjunk a környezeti mintákról (FARRÉ et al. 2001).

KOVÁTS és társai (2004) egy alumíniumipari veszélyeshulladék-lerakó környezetének esetleges talajszennyezettségét vizsgálták. A mintákat a talaj felső részéből vették, majd vizes kivonattal mérték a toxikus hatást *Vibrio fischeri* tesztorganizmussal. A mérés megbízhatóságát ugróvillás (*Folsomia candida*) és televényféreg (*Enchytraeus albidus*) reprodukciós tesztekkel, ill. talajzoológiai vizsgálatokkal (*Nematoda sp.*) ellenőrizték. A lerakó közvetlen környezetében vett minták toxikusnak mutatkoztak a baktériumteszt szerint két összefüggő területen. A szabványos talaj toxicitás tesztek és a talajzoológiai vizsgálatok eredményei csak részben fedték egymást a ToxAlert alkalmazása során kapott eredményekkel. A *Vibrio fischeri* és az *Enchytraeus albidus* reprodukció, valamint az Maturity Index (*Nematoda sp.*) értékei között azonban így is korreláció mutatkozott. Bár a vizsgálati eredmények értékelésében voltak eltérések, mindenképpen javasolják a baktériumtesztnek a kármentesítés első, diagnosztikai fázisban való alkalmazását. A szerepe érzékenysége mellett gyorsaságában rejlik, hiszen a leghosszabb expozíciós idő is csak 30 perc, a többi tesztnél alkalmazott 4-8 hetes időszakhoz képest.

5. Összefoglalás

A *Vibrio fischeri* baktériumnak kiemelkedően magas publikált adatbázisa van: csak ebben az évben eddig a Google Scholar szerint több száz tanulmány jelent meg a témával kapcsolatban. A szakirodalom egyértelműen kiemeli a teszt gyorsaságát, kis mintaigényét, költség-hatékonyságát és jó reprodukálhatóságát. A különböző készülékeken mért adatok jól korrelálnak. A legtöbb szerző fontosnak tartja, hogy a baktériumteszt használata nem okoz etikai problémát. Bár többnyire vizes fázisú minták mérésére alkalmazzák a tesztet, azonban LAPPALAINEN (2001) által kidolgozott kinetikus mérés lehetővé tette a szilárd minták pontosabb ökotoxikológiai vizsgálatát a tesztszervezettel. Erre a Flash eljárásra a finn Aboatox gyártó megalkotta az Ascent készüléket, így már közvetlenül is lehetővé vált a színes, zavaros minták toxicitásának mérése. A *Vibrio fischeri* érzékenysége szerves anyagok tekintetében sokszor elmarad más tesztszervezetekhez képest (CZECH *et al.* 2014, GATIDOU *et al.* 2015, FERNANDEZ-ALBA *et al.* 2001), de emellett olyan irodalmat is találhatunk, amelyekben más teszthez viszonyítva azonos vagy nagyobb hatást mutatott (KAISER 1998, KOVÁTS *et al.* 2007, YU *et al.* 2014), sőt túlérzékenynek is találták a mikrobiotesztet (DALZELL *et al.* 2002). A baktérium nehézfémekre való érzékenységét a legtöbb szerző megfelelőnek találja, bár bizonyos elemeknél (Co, Cd, Cr) a vártnál kisebb hatás mérhető. Kadmium esetén a hatáscsökkenés abból adódik, hogy a Gram-negatív baktériumok külső membránja képes adszorbeálni az iont. Összességében elmondható, hogy a *Vibrio fischeri* biolumineszcencia gátláson alapuló teszt tökéletesen alkalmas minták toxicitásának gyors előszűrő vizsgálatára. Más tesztekkel együtt alkalmazva mindenképpen szerepet kap a környezeti kockázatbecslésben, a már meglévő károk kiszűrésében pedig nélkülözhetetlen, gyorsasága és megfelelő érzékenysége miatt.

IRODALOM

- ABBONDANZI, F., CACHADA, A., CAMPISI, T., GUERRA, R., RACCAGNI, M., LACONDINI, A. (2003): Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox assay. *Chemosphere* 53(8): 889–897.
- BAUDA, P., BLOCK, J. C., (1990): Role of envelopes of Gramnegative bacteria in cadmium binding and toxicity. *Toxicity Assess* 5(1): 47–60.

- CAMPISI T., ABBONDANZI F., CASADO-MARTINEZ C., DELVALLS T. A., GUERRA R., IACONDINI A. (2005): Effect of sediment turbidity and color on light output measurement for Microtox Basic Solid-Phase Test. *Chemosphere* 60(1): 9–15.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2001): White Paper. Brussels.
- CZECH, B., JOŠKO, I., OLESZCZUK, P. (2014): Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 247–253.
- DALZELL, D. J. B., ALTE, S., ASPICHUETA, E., DE LA SOTA, A., ETXEARRIA, J., GUTIERREZ, M., HOFFMANN, C. C., SALES, D., OBST, U., CHRISTOFI, N. (2002): A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*. 47(5): 535–545.
- FARRÉ, M., FERRER, I., GINEBREDÁ, A., FIGUERAS, M., OLIVELLA, L., TIRAPUC, L., VILANOVAC, M., BARCELO, D. (2001): Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A* 938(1–2): 187–197.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., GUIL, L. H., LÓPEZ, G. D., CHISTI, Y. (2001): Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta* 426(22): 289–301.
- FULLADOSA, E., MURAT, J. C., MARTINEZ, M., VILLAESCUSA, I. (2005a): Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere* 60(1): 43–48.
- FULLADOSA, E., MURAT, J. C., VILLAESCUSA, I. (2005): Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 58(5): 551–557.
- GATIDOU, G., STASINAKIS, A. S., IATROU, E. I. (2015): Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere* 119: 569–574.
- GRUIZ K., HORVÁTH B., MOLNÁR M. (2001): Környezettoxikológia. Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára. Műegyetemi Kiadó, Budapest.
- HEINLAAN, M., IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIER, H. C., KAHRU, A. (2008): Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71(7): 1308–1316.

- JENNINGS, V. L. K., RAYNER-BRANDES, M. H., BIRD, D. J.* (2001): Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research* 35(14): 3448–3456.
- KAISER, K. L. E.* (1998): Correlation of *Vibrio fischeri* Bacteria Test with Bioassay Data for Other Organisms. *Environmental Health Perspectives* 106(52): 583–591.
- KERESZTÉNYI I.* (2008): Kőolajipari termékek és előállításuk során képződő szennyvizek biológiai tisztításának ökotoxikológiai jellemzése, Gödöllő, Szent István Egyetem, Doktori (PhD) értekezés 56.
- KOVÁTS N., REICHEL A., SZALAY T., BAKONYI G., NAGY P.* (2004): ToxAlert teszt alkalmazása talajszennyezettség minősítésére. *Agrokémia és Talajtan* 53(3–4): 343–354.
- KOVÁTS N., ÁCS A., KOVÁCS T. VASAS G., HIRIPI, L., PAULOVITS G.* (2007): Screening potential of *Vibrio fischeri* bioluminescence-inhibition bioassay for assessing cyanobacterial toxicity. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 13(3–4): 335–344.
- LAPPALAINEN, J., JUVONEN, R., NURMI, J., KARP, M.* (2001): Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays. *Chemosphere* 45(4–5): 635–641.
- MIYASHIRO T., RUBY E. G.* (2012): Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology* 84(5): 795–806.
- URBANCZYK, H., AST, J. C., HIGGINS, M. J., CARSON, J., DUNLAP, P. V.* (2007): Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(12): 2823–2829.
- PARVEZ, S., VENKATARAMAN, C., SUPARNA MUKHERJI, S.* (2006): A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 32(2) 265–268.
- VILLA, S., VIGHI, M., FINIZIO, A.* (2014): Experimental and predicted acute toxicity of antibacterial compounds and their mixtures using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 108: 239–244.
- VISICK K. L., MCFALL-NGAI M. J.* (2000): An Exclusive Contract: Specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Partnership. *Journal of Bacteriology* 182(7): 1779–1787.
- YU X., ZUO J., TANG X., LIR, LIZ, ZHANG F.* (2014): Toxicity evaluation of pharmaceutical wastewaters using the alga *Scenedesmus obliquus* and the bacterium *Vibrio fischeri*. *Journal of Hazardous Materials* 266: 68–74.