

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KLÁTYIK SZANDRA

Gödöllő

2021



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**MEZŐGAZDASÁGI EREDETŰ KÉMIAI SZENNYEZŐK
ÖKOTOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATAI
ALACSONYABB RENDŰ VÍZI SZERVEZETEKEN**

DOKTORI (*PhD*) ÉRTEKEZÉS

KLÁTYIK SZANDRA

Gödöllő

2021

A doktori iskola

Megnevezése: MATE Biológiatudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia tudományok

Vezetője: Dr. Nagy Zoltán

tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora *DSc*

MATE, Szent István Campus

Növénytermesztési-tudományok Intézet

Növényélettan és Növényökológia Tanszék

Témavezető: Dr. Székács András

intézetigazgató-helyettes, c. egyetemi tanár, tudományos tanácsadó,

az MTA doktora *DSc*

MATE, Szent István Campus

Környezettudományi Intézet

Agrár-környezettudományi Kutatóközpont, Budapest

Társtémavezető: Dr. Nagy Péter István

tanszékvezető, egyetemi tanár, *PhD*

MATE, Szent István Campus

Vadgazdálkodási és Természetvédelmi Intézet

Állattani és Ökológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

„Az ember által a környezete ellen elkövetett
merényletek legriasztóbbika a föld, a vizek és
a levegő elszennyezése veszélyes vagy éppen
végzetes hatású anyagokkal.”

Rachel Carson (Néma tavasz)
fordította: Makovecz Benjámin

Szüleimnek

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	iv
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A biológiailag aktív vegyületek ökotoxikológiai értékelésének jelentősége és módszerei	6
2.2. Szulfonamidok és a <i>trimethoprim</i> jellemzése és állatgyógyászati készítményekben történő felhasználása	7
2.3. Neonikotinoid-típusú hatóanyagok jellemzése és felhasználása a kémiai növényvédelemben	10
2.4. A <i>glyphosate</i> jellemzése és felhasználása a kémiai növényvédelemben	12
2.5. A felületaktív anyagok jellemzése és szerepe az állatgyógyászati és növényvédőszer-készítményekben.....	15
2.6. A tesztek során felhasznált vízi szervezetek és életközösségek jellemzése és alkalmazása az ökotoxikológiában.....	18
2.6.1. <i>A nagy vízibolha (Daphnia magna)</i>	18
2.6.2. <i>Az algák jellemzése, különös tekintettel a cianobaktériumokra és a zöldalgafajokra</i>	18
2.6.3. <i>Felszíni vizekben kialakuló biofilmműködők</i>	21
2.7. A környezetanalitikai vizsgálatok jelentősége és módszerei a különböző szennyezőanyagok meghatározása során	24
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	27
3.1. A vizsgált hatóanyagok, készítmények és adalékanyagok jellemzése	27
3.2. A nagy vízibolhán (<i>Daphnia magna</i>) végzett ökotoxikológiai vizsgálatok	28
3.2.1. <i>A nagy vízibolha (Daphnia magna) tenyésztésének fenntartása</i>	29
3.2.2. <i>Akut immobilizációs vizsgálat</i>	30
3.2.3. <i>A glutation-S-transzferáz aktivitásának meghatározása nagy vízibolha (Daphnia magna) juvenilekben</i>	32
3.3. Lebegő életmódú, egysejtű algafajokon végzett ökotoxikológiai vizsgálatok	35
3.3.1. <i>Az algatenyészetek fenntartása</i>	35
3.3.2. <i>Algaszaporodás-gátlási tesztek</i>	36
3.3.3. <i>Fotoszintetikus aktivitás vizsgálata algaszuszpenziókban</i>	39
3.4. Közösségi szintű vizsgálatok biofilmekben.....	41
3.4.1. <i>Felszíni vízi biofilmek természetes körülmények között történő növesztésének módszere</i>	41
3.4.2. <i>A biofilmvizsgálatok során alkalmazott kísérleti elrendezés és kezelések</i>	43
3.4.3. <i>Biofilmek algabiomasszájának és szerkezetének vizsgálati módszerei</i>	44

3.4.4. Balatoni és dunai biofilmek kovaalga-közösségein elvégzett vizsgálatok.....	48
3.5. Analitikai vizsgálatok	49
3.5.1. A glyphosate lebomlásának vizsgálata felszínivízmintákban	49
3.5.2. A lineáris alkil-benzol-szulfonátok lebomlásának vizsgálata vizes közegben.....	51
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....	54
4.1. Állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények hatásai nagy vízi bolha (<i>Daphnia magna</i>) tesztsszervezeten	54
4.1.1. Állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények akut toxicitása <i>Daphnia magna</i> immobilizációs vizsgálatokban	54
4.1.2. A sulfamethoxazole és trimethoprim állatgyógyászati hatóanyagok és formázott készítményük enzimaktivitásra gyakorolt hatásai <i>Daphnia magna</i> juvenilekben	56
4.2. A neonikotinoid-készítményekben alkalmazott hatóanyagok és adalékanyagok egyedi és kombinált toxikus hatásai	58
4.2.1. A vizsgált neonikotinoid-típusú készítmények és összetevőinek akut toxicitása <i>Daphnia</i> <i>magna</i> immobilizációs vizsgálatokban	58
4.2.2. Az acetamipid és a lineáris-alkil-benzolszulfonátok (LAS) enzimaktivitásra gyakorolt egyedi és kombinált hatásai <i>Daphnia magna</i> juvenilekben	61
4.3. Glyphosate hatóanyag-tartalmú készítmények összetevőinek egyedi és kombinált toxicitása vízi tesztsszervezeteken	64
4.3.1. A vizsgált glyphosate-tartalmú készítmények és összetevőinek akut toxicitása <i>Daphnia</i> <i>magna</i> immobilizációs vizsgálatokban	64
4.3.2. Fitotoxikus hatások algaszaporodás-gátlási vizsgálatokban és a fotoszintetikus aktivitás meghatározása során lebegő algafajok esetében	67
4.4. Biofilmekén végzett közösségi szintű vizsgálatok eredményei	76
4.4.1. A glyphosate hatásai balatoni és dunai biofilmek algaközösségeinek biomasszájára és a biofilmek szerkezetére.....	77
4.4.2. A glyphosate-tartalmú ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek hatásai dunai és velencei- tavi biofilmek algaközösségeinek biomasszájára	82
4.4.3. Biofilmek kovaalga-közösségein végzett vizsgálatok eredményei	89
4.5. Az analitikai vizsgálatok eredményei	94
4.5.1. A glyphosate lebomlásának vizsgálata felszínivízmintákban	94
4.5.2. A lineáris alkil-benzol-szulfonátok (LAS) lebomlásának vizsgálata vizes közegben.....	99
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	103
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	105
7. ÖSSZEFOGLALÁS	110

8. SUMMARY	114
1. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK	118
2. MELLÉKLET: PUBLIKÁCIÓS LISTA	158
3. MELLÉKLET: A VIZSGÁLT HATÓANYAGOK ÉS KÉSZÍTMÉNYEK	166
4. MELLÉKLET: A BIOFILMVIZSGÁLATOK JELLEMZŐI.....	169
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	170

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE	<i>acetamiprid</i>
AMPA	amino-metil-foszfonsav
APG	alkil-poliglükózid
BM	a természetes körülmények között kialakult biofilmek algaközösségének biomasszáját jellemző érték, amely az algafáklya által különböző mérési pontokban algacsoportonként meghatározott klorofill-a-adatok összege
BM(t ₀)	a kezdeti időpontban (expozíciót megelőzően) meghatározott BM-érték
BM(t)	az adott mintavételi időpontban meghatározott BM-érték
BSA	marhaszérumból származó albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c1–c5	A kovaalgafajok esetében alkalmazott sejtméret-kategóriák, amelyekben a sejt térfogata < 99 μm ³ (c1), 100–299 μm ³ (c2), 300–599 μm ³ (c3), 600–1499 μm ³ (c4) vagy > 1500 μm ³ (c5)
CLO	<i>clothianidin</i>
CDNB	1-klór-2,4-dinitro-benzol
DNS	dezoxiribonukleinsav
DT ₅₀	felezési idő
ECHA	Európai Vegyianyag-ügynökség (<i>European Chemicals Agency</i>)
EC _x	effektív koncentráció, amely a vizsgált biológiai paraméterben x%-os csökkenést eredményez a kontrollcsoportéhoz képest
EFSA	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (<i>European Food Safety Authority</i>)
EMA	Európai Gyógyszerügynökség (<i>European Medicines Agency</i>)
EPS	extracelluláris polimeranyagok (<i>extracellular polymeric substance</i>)
EPSP	5-enol-piruvil-sikiminsav-3-foszfát
FMM	<i>FluoroMeter Modul</i>
FMOC-Cl	9-fluorenil-metiloxi-karbonil-klorid (<i>9-fluorenylmethyl chloroformate</i>)
Fp	maximális fluoreszcencia
Fs	a stacionárius fázisban elért fluoreszcens intenzitás
Fv	változó fluoreszcencia
Fv/Fp	a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát jellemző paraméter
GLY	<i>glyphosate</i>
GLY-IPA	<i>glyphosate</i> -izopropilammónium-só
GM	géntechnológiai úton módosított
GST	glutathion-S-transzferáz enzim

HP	magas profilú (<i>high profile</i>) ökológiai <i>guild</i>
HPLC-UV	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (<i>high performance liquid chromatography</i>) UV detektálással
IMI	<i>imidacloprid</i>
IPS	integrált szennyezettségi index (<i>index of pollution sensitivity</i>)
LAS	lineáris alkil-benzol-szulfonátok
LC-MS/MS	folyadékkromatográfiával (<i>liquid chromatography</i>) kapcsolt tandem tömegspektrometria (<i>mass spectrometry</i>)
LP	alacsony profilú (<i>low profile</i>) ökológiai <i>guild</i>
MO	mozgásra képes (<i>motilis</i>) morfológiájú (<i>motile</i>) ökológiai <i>guild</i>
MRL	maximális szermaradék-határérték (<i>maximum residue limit</i>)
OD	optikai sűrűség, optikai denzitás (<i>optical density</i>)
OECD	Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
PL	planktonikus (<i>planktic</i>) ökológiai <i>guild</i>
POEA	polietoxilált faggyúaminok keveréke (új rövidítés szerint POE 15 <i>faggyúamin</i> vagy <i>POEA 15 faggyú</i>)
REACH rendelet	a vegyi anyagok regisztrálásával, értékelésével, engedélyezésével és korlátozásával kapcsolatos előírásokat rögzítő rendelet („ <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> ”)
Rfd	a fotoszintetikus aktivitást jellemző vitalitásindex (<i>fluorescence decrease ratio</i>)
RNS	ribonukleinsav
SDZ	<i>sulfadiazine</i>
SEM	pásztázó elektronmikroszkópos módszer (<i>scanning electron microscopy</i>)
SGD	<i>sulfaguanidine</i>
SMX	<i>sulfamethoxazole</i>
SMZ	<i>sulfamethazine</i>
TCL	<i>thiacloprid</i>
TMX	<i>thiamethoxam</i>
TRI	<i>trimethoprim</i>
US EPA	Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (<i>World Health Organization</i>)

1. BEVEZETÉS

A Földünkön tapasztalható folyamatos népességnövekedés következményeként egyre jelentősebbé váltak az erőforrások (pl. élelmiszer, ivóvíz, nyersanyagok) fokozott előállítására és a megnövekedett igények kielégítésére irányuló mezőgazdasági technológiák. A különböző állatgyógyászati és növényvédőszer-készítmények jelentős hányada fokozott kémiai terhelést gyakorol környezetünkre (DARVAS 2000), mivel a hatóanyagok és a formázáskor használt segédanyagok bekerülhetnek a talajba és a felszíni vizekbe, ezáltal a talajvízbe, elszennyezve az ökoszisztémák ivóvízbázisait és táplálékhálózatait, ahol mennyiségük meghaladhatja a megengedett egészségügyi határértékeket (SZÉKÁCS és DARVAS 2006). Az állatgyógyászati készítmények alkalmazása során a hatóanyagok az állati szervezetekből metabolizmust követően változatlan formában vagy metabolitként, az állat ürülékével és vizeletével, kezelt állattól származó trágya mezőgazdasági területekre történő kijuttatásával, halgazdaságok kezelésével és a külsőleg alkalmazott gyógyszerhatóanyagok esetében a fürdővízzel juthatnak a legelőkre vagy a helyi csatornahálózatokba, majd a tisztított szennyvízzel a felszíni vizekbe (RADKE *et al.* 2009, PORTER 2011). A kémiai növényvédelem esetében a kijuttatott hatóanyagok a kezelt területekről való beszivárgással, elfolyással, lemosódással, csapadékkal és a nem megfelelő agrotechnika következményeként érik el a felszíni víztesteket. Az adott környezeti elemekben kialakuló toxikus hatásokat jelentősen befolyásolja az adott vegyület vízzoldékonysága, perzisztenciája és a toxikus metabolitok keletkezésének esélye (SZÉKÁCS és DARVAS 2006). A környezeti közegekben megjelenő szermaradványok esetében – a szerhasználat alakulásával összhangban – időről időre más hatóanyagok kerülnek a figyelem középpontjába. Bizonyos vegyületek perzisztens jellegük miatt hosszú ideig, tartósan kimutathatók a környezeti mintákból, más hatóanyagok viszont a túlzott pillanatnyi felhasználás következtében jelennek meg a környezeti mátrixban. A vízi közösségekben élő szervezetek fokozottan ki vannak téve a szennyezéseknek, mivel a vízben a xenobiotikumokkal történő érintkezés elkerülhetetlen.

Napjainkban a gyógyszermaradványok felszíni vizekben való megjelenése azok potenciális biológiai hatásai miatt egyre nagyobb figyelmet kap (SÁGI *et al.* 2018, ZÁRAY 2018), különösen az antibiotikus hatású anyagok esetében a bakteriális rezisztencia kialakulásának veszélye (KOBAYASHI *et al.* 2007) és a vízi szervezetekre gyakorolt letális és szubletális hatások lehetősége miatt. A humán- és állatgyógyászatban széles körben alkalmazott, antibakteriális hatású szulfonamid-típusú [pl. *sulfamethoxazole* (SMX)] vegyületeket hazánkban is több gyógyászati készítmény aktív hatóanyagaként használják fel (NÉBIH 2021a). A szulfonamidok hatását a különböző készítményekben a *trimethoprim* (TRI) hatóanyag együttes alkalmazásával erősítik fel, ugyanis a két hatóanyag között jelentős mértékű szinergizmus

figyelhető meg. A szulfonamidok alacsony szorpciós kapacitása miatt gyorsan elérhetik a talajvíz szintjét, és megjelenhetnek a felszíni vízbázisokban (SUKUL és SPITELLER 2006, ZINNER és MAYER 2015).

A növényvédőszer-maradványok szintén számottevő környezeti kockázati tényezőkként jelentkeznek (SZÉKÁCS 1999), amely szermaradékok tekintetében az elmúlt évek nagy kérdései a rovarirtó szerként alkalmazott neonikotinoidok és a herbicid hatású *glyphosate* (GLY) engedélyezéséhez köthetők. Habár a GLY felhasználása jóval meghaladja a neonikotinoid-típusú hatóanyagokét, utóbbiakat mégis előbb tárgyalom, mivel e rovarölő hatóanyagok esetében a jogi szabályozás során sokkal egységesebb álláspont alakult ki. A világszerte jelentős mértékben felhasznált neonikotinoid-típusú rovarölők hatóanyagai mára ubikviter szennyezőkké váltak, jelenlétüket még fokozottan védett természetvédelmi területekről származó talaj-, víz- és üledékmintákból is kimutatták már (BONMATIN *et al.* 2019). A felszívódó hatású (szisztémikus) neonikotinoid-típusú hatóanyagok nemcsak a különböző növényi részekben, hanem a növények guttációs folyadékban is megjelennek, ezzel fokozva az ízeltlábú nem célszervezetek kitettségét (GIROLAMI *et al.* 2009, MÖRTL *et al.* 2017). A neonikotinoidok alkalmazása különösen veszélyezteti a beporzó rovarfajokat (GOULSON 2013, WOODCOCK *et al.* 2017), így felhasználásuk, főleg a virágzó kultúrákban szigorúan korlátozott az Európai Unió (EU) területén (EUROPEAN COMMISSION 2013a, 2018a, 2018b, 2018c, 2018d).

A világszinten piacvezető GLY totális hatású gyomirtó és állományszárító (DARVAS és SZÉKÁCS 2018a), amelynek felszíni vizekben való megjelenése mára globálisan tapasztalható jelenség (MÖRTL *et al.* 2013), főként azokon a területeken, ahol az állományszárítás gyakorlata kiterjedt és a GLY-toleráns, géntechnológiai úton módosított (GM) növények termesztése és ezzel együtt a GLY-tartalmú készítmények felhasználása jelentős, a szennyezés szintje elérheti akár az 5200 µg/l nagyságrendet is (COUPE *et al.* 2012, DARVAS és SZÉKÁCS 2018b). A GLY humánegészségügyi hatásainak vonatkozásában azonban nincs egységes álláspont (DARVAS és SZÉKÁCS 2018c), ugyanis az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (U.S. Environmental Protection Agency, US EPA) a GLY hatóanyagot az „emberen valószínűleg nem rákkeltő” anyagok között tartja számon. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (European Food Safety Authority, EFSA) és az Európai Vegyianyag-ügynökség (European Chemicals Agency, ECHA) álláspontja összecseng az amerikai véleménnyel, miszerint a GLY nem valószínű, hogy rákkeltő a humán szervezetek számára, ezzel szemben az Egészségügyi Világszervezeten (World Health Organization, WHO) belül működő Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (International Agency for Research on Cancer, IARC) a „valószínűleg emberre rákkeltő” (2A) anyagok közé sorolta a GLY hatóanyagot (SZÉKÁCS és DARVAS 2018).

Az állatgyógyászatban alkalmazott és a kémiai növényvédelem során kijuttatott készítmények az aktív hatóanyagon kívül különböző adalékanyagokat, ezen belül formázóanyagokat is tartalmaznak. A formázószeres elsődleges célja, hogy fokozzák a készítmény hatékonyságát és biológiai hozzáférhetőségét, azáltal, hogy növelik az oldhatóságot, adszorpciót és a hatóanyag felszívódását (FOY 1987). A készítmények előállítása során alkalmazott adalékanyagokat – a készítmény biológiai főhatásának szempontjából – sokáig inaktív (*inert*) összetevőknek minősítették, ezért esetükben az aktív hatóanyagokhoz képest egyszerűbb környezeti kockázatelemzés végrehajtása is elegendő volt (US EPA 1997, FISHEL 2005). Az utóbbi években azonban számos tanulmányban igazolták, többek között a GLY és formázott készítményeinek előállítása során felhasznált formázóanyag, a POEA (polietoxilált faggyúaminok keveréke) esetében is a formázószer magas önálló toxicitását, valamint a ható- és adalékanyagok fokozott együttes toxicitását a GLY egyedi hatásához képest (TSUI és CHU 2003, SZÉKÁCS 2017, MESNAGE *et al.* 2019). A tudományos terhelő bizonyítékok hatására a POEA formázóanyagként való alkalmazása GLY-tartalmú készítményekben az EU hatályos jogi szabályozásának értelmében betiltásra került (EUROPEAN COMMISSION 2016). A különböző hatóanyagok közötti és az adalékanyagokkal együttes hatások vizsgálata kiemelt fontosságú, mivel a hatóanyagok többsége keverékek formájában van jelen környezetünkben.

Munkám során a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Agrár-környezettudományi Kutatóintézet [2021. február 1-től Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Környezettudományi Intézet (KÖTI), Agrár-környezettudományi Kutatóközpont (AKK)] Ökotoxikológiai Osztályának kutatócsoportjához csatlakoztam, amely jelentős, hazai és nemzetközi viszonylatban is elismert környezetanalitikai és ökotoxikológiai tudományos műhely. Minthogy a kutatócsoport dolgozatom témakörébe eső eredményeiből született publikációiban társszerző voltam, így azok a dolgozat szempontjából új eredménynek számítanak, ezeket a publikációkat nem a szakirodalmi áttekintés során, hanem az eredményeket ismertető részeket követően a 2. mellékletben mutatom be.

A dolgozatban a hatóanyagneveket a nemzetközi engedélyezés szerint elfogadott alakban közlöm, így az állatgyógyászati hatóanyagok neveit az Európai Unió Állatgyógyászati készítmények adatbázisában (*EU Veterinary Medicinal Product Database*) (EMA 2021) míg a növényvédőszer-hatóanyagok neveit az Európai Unió Növényvédőszeres adatbázisában (*EU Pesticides Database*) (EUROPEAN COMMISSION 2021) a *Pesticide Manual* kézikönyvben (MACBEAN 2012) és az engedélyokiratokban rögzített alakban tüntetem fel. Ennek oka az, hogy a növényvédőszer-hatóanyagok engedélyezése az EU tagországaiban nem nemzeti, hanem EU-szinten történik, illetve az egyes hatóanyagok neveinek fonetikus átírataiban gyakorta

mutatkozik eltérés. [Meglehet, a dolgozatban szereplő hatóanyagok neveiben nem igen mutatkoznak ilyen eltérések, de más hatóanyagok esetében (pl. *dichlorvos*) többféle átírás is gyakorlatban van, ami félreértésekre adhat okot. Emiatt kutatóhelyem, a MATE KÖTI AKK a nemzetközi engedélyezés szerinti alakra hivatkozik.]

A PhD kutatásaim során elvégzett vizsgálatok célja az volt, hogy meghatározzuk és összehasonlítsuk a szulfonamid-típusú *sulfadiazine* (SDZ), *sulfaguanidine* (SGD), *sulfamethazine* (SMZ), *SMX* és a *TRI* állatgyógyászati hatóanyagok, valamint a rovarölő hatású neonikotinoid-típusú *acetamiprid* (ACE), *clothianidin* (CLO), *thiacloprid* (TCL) és *thiamethoxam* (TMX) illetve a gyomirtó *GLY* hatóanyagok egyedi, továbbá formázott készítményeikben megtalálható adalékanyagaikkal együttes toxicitását különböző alacsonyabb rendű vízi testszervezeteken. A vizsgált anyagok egyedi és együttes toxikus hatásainak meghatározása különböző *in vivo* ökotoxikológiai tesztrendszerekben valósult meg egyedi, valamint közösségi szinten. Az ökotoxikológiai vizsgálatok mellett a vizsgálatok célja volt a *GLY* és a neonikotinoid-készítményekben felhasznált lineáris alkil-benzol-szulfonátok (*LAS*) vizes közegben kialakuló környezeti koncentrációinak környezetanalitikai módszerekkel történő nyomonkövetése is.

A kiválasztott hatóanyagok hatásait több esetben vizsgálták már különböző nem célszervezeteken, de az eredmények többnyire egy vizsgálati anyagnak egy fajra gyakorolt akut hatásait vizsgáló kutatásokból származnak. Az állatgyógyászati készítmények esetében az előírt ökotoxikológiai vizsgálatokat mindig a formázott készítményeken kell elvégezni, ezzel szemben a növényvédő szereknél bizonyos esetekben támaszkodhatnak a hatóanyag toxicitási adataira az engedélyezési folyamatok során. A hatóanyagok és a formázóanyagok egyedi, valamint az együttes alkalmazásuk során kialakuló potenciális toxikus hatások felderítése alapvető feltétele a mezőgazdasági eredetű szennyezők megfelelő környezeti kockázatbecslésének.

Eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni az állatgyógyászati és növényvédőszer-hatóanyagok egyedi és formázott készítményeikben megtalálható adalékanyagaikkal együttes kockázatainak és mellékhatásprofiljainak részletesebb megismeréséhez. Kutatásaink révén jobban megismerhetővé válik a vizsgált mezőgazdasági kémiai eredetű szennyezők vízi toxicitása állati- és növényi testszervezetekre, egyedi és közösségi szinten, az adott szennyező akut vagy krónikus expozícióját követően. A toxicitást jellemző paraméterek meghatározása mellett környezetanalitikai vizsgálataink eredményeivel pontosabb képet kaphatunk a *GLY* és a *LAS* környezeti sorsának alakulásáról különböző felszíni vizekben. A kapott eredmények a későbbiekben felhasználhatók lehetnek a ható- és adalékanyagok környezeti kockázatbecslése során, valamint monitorozási programok tervezésénél.

A célkitűzések megvalósítása során tervezett konkrét kutatási feladatok az alábbiak voltak:

- a szulfonamid-típusú *SDZ*, *SGD*, *SMZ*, *SMX* valamint *TRI* állatgyógyászati hatóanyagok és a neonikotinoid-típusú *ACE*, *CLO*, *TCL* és *TMX* növényvédőszer-hatóanyagok egyedi és a formázott készítményeikben megtalálható adalékanyagaikkal együttes akut toxikus hatásainak vizsgálata a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) immobilizációjára és a glutation-S-transzferáz enzimaktivitásra;
- a *GLY*-tartalmú *ROUNDUP CLASSIC* és *MEDALLON PREMIUM* készítmények összetevőinek egyedi és kombinált toxikus hatásainak vizsgálata *D. magna* immobilizációjára, továbbá lebegő egysejtű zöld- (*Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scendesmus obtusiusculus*) és kékalga- (*Anabaena flos-aquae*) fajok szaporodására és fotoszintetikus aktivitására;
- a *ROUNDUP CLASSIC* és összetevőinek hatásvizsgálata a hazai felszíni folyó- és állóvíztestekben (Duna, Balaton, Velencei-tó) természetes körülmények között kialakuló biofilmek algaközösségeinek biomasszájára, a biofilmek szerkezetére és kovaalga- (*Bacillariophyceae*) közösségeinek összetételére;
- a *GLY* lebomlásának vizsgálata dunai és balatoni felszínivízmintákban tiszta hatóanyag és formázott készítmény (*ROUNDUP CLASSIC*) formájában, biofilmek jelenlétében és anélkül;
- a neonikotinoid-készítmények formázása során alkalmazott *LAS* lebomlásának vizsgálata vizes közegben és változatos kísérleti beállításokban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A biológiailag aktív vegyületek ökotoxikológiai értékelésének jelentősége és módszerei

A környezeti elemekben megjelenő biológiailag aktív vegyületek kölcsönhatásba lépnek az ökoszisztémák abiotikus és biotikus elemeivel. Napjainkban számos adat áll rendelkezésre a különböző ágensek akut toxicitásával kapcsolatban, azonban a vizsgálati eredményekből történő extrapoláció során nagy a bizonytalanság, elsősorban a fajok közötti különbségek és az eltérő expozíciós időtartamok miatt. Az akut toxicitás alapján nem mindig lehet következtetéseket levonni a hosszabb ideig fennálló (krónikus) hatásokra vonatkozóan, továbbá a tiszta vegyületek vizsgálata során nem jutunk megfelelő információkhoz a vegyi anyagok között fellépő együttes (pl. additív, szinergens vagy antagonista) hatásokra vonatkozóan (VERDONCK *et al.* 2007).

Az akut toxikus hatásokkal szemben jelentős hiányosságok mutatkoznak a vegyi anyagok kis (szubletális) koncentrációinak krónikus [pl. reprodukciós, teratogén (rendellenes fejlődési), mutagén (az örökítő anyagot megváltoztató), karcinogén (rákkeltő), hormonmoduláns és immunmoduláns hatások] akár egész élettartamot felölelő vagy több nemzedék expozíciója során kialakuló komplex toxikus hatásokat tekintve. A vegyi anyagok és keverékeinek kombinált hatásainak feltérképezésében a több fajt alkalmazó és a közösségi szinten végzett vizsgálatok száma csekély. A szakirodalomban található eredmények többnyire egy vegyület/készítmény, egy fajra gyakorolt hatásait vizsgáló kutatásokból származnak, ezért az együttes hatások vizsgálata hiánypótló a mezőgazdasági eredetű szennyezők környezeti kockázatbecslése során.

Az ökotoxikológiai vizsgálatokat többnyire hazai és nemzetközi szabványok, nemzetközi szervezetek [pl. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (*Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD*), WHO] irányelveinek és ajánlásainak alapján, továbbá saját módszerek fejlesztésével valósítjuk meg. Az egy fajt alkalmazó tesztek jól használhatók különböző élettani hatások leírására és ha (öko)toxikológiai határértékek meghatározása vagy a fajok közötti érzékenység összehasonlítása a cél. Az egy fajon végzett vizsgálatok előnyei, hogy viszonylag könnyen kivitelezhetők, alacsony költségűek és jól reprodukálhatók, azonban környezetileg kevésbé relevánsak, mivel természetes körülmények között nemcsak egy faj egyedei, hanem különböző fajok népességei kerülnek kapcsolatba a szennyezőanyagokkal. Az ökotoxikológiai tesztekben alkalmazott tesztszervezetek azonban mindig valamely adott élőlénycsoportokat modelleznek (pl. vízi egysejtű növényi szervezetek: algák; vízi gerinctelenek: vízibolhák; vízi gerincesek: halak; talajlakó szervezetek: földigiliszták, ugróvillások, fonáférgék; beporzó rovarok: házi méhek) a környezeti relevancia javításának érdekében. A több fajt alkalmazó tesztek előnye, hogy a fajok közötti kölcsönhatások, akár közösségi szinten is

vizsgálhatóvá válnak (CULP *et al.* 2000, BAKONYI 2020a). A vizsgálatok tárgya és mérési végpontjai a biológiai rendszerek bármely szerveződési szintjére kiterjedhet. Molekuláris szinten vizsgálhatók a biokémiai paraméterekben bekövetkező változások (pl. stresszfehérjék termelése, enzimaktivitás gátlása), míg az egyedek szintjén elsősorban a fiziológiás jellemzőkben (pl. mortalitás, reprodukciós hatások, karcinogenitás vizsgálata akár több generáción keresztül) és a viselkedésben (pl. mozgásképtelenség) bekövetkező változásokat vizsgálják. Magasabb szerveződési szinteken, így a populációk esetében vizsgálható többek között az adott populáció sűrűsége, produktivitása, a genetikai struktúra megváltozása, míg a közösségek szintjén jellemezhetők például a közösség összetételében, diverzitásában bekövetkező változások (GRUIZ *et al.* 2001).

Az ökotoxikológiai tesztelés során a különböző biomarkerek hatékony eszközei a szennyezőanyagok expozícióját követően a fiziológiai és biokémiai paraméterekben bekövetkező változások detektálásának (KOEMAN *et al.* 1993, WALKER *et al.* 2012). A biomarkerek alkalmazása a környezeti kockázatbecslés során egyre nagyobb figyelmet kap (KEUM *et al.* 2013). A glutation-S-transzferáz (GST) enzim aktivitásának változása a detoxifikációs folyamatok egyik fontos indikátora az ökotoxikológiában. A II-es fázisú detoxifikáló enzimek közé tartozó GST fontos szerepet tölt be a xenobiotikumok biotranszformációjában (detoxifikációs folyamatokban) és az antioxidáns védelmi rendszerben egyaránt. A GST ugyanis katalizálja a xenobiotikumok, illetve az oxidatív stressz során keletkezett káros termékek konjugációját a redukált glutation tiolesoportjával, amelyet követően a kialakuló metabolitok reaktivitása csökken, míg vízoldhatósága nő, elősegítve a további metabolizációt vagy eliminációjukat a szervezetből (HABIG *et al.* 1974, ZHANG *et al.* 2012, SONG *et al.* 2017). A GST lehetséges biomarkere és korai figyelmeztető jele bizonyos szennyező anyagok (pl. Cr^{6+} , Cd^{2+} és a talajfertőtlenítő hatású *diazinon*) káros hatásainak a vízi ökoszisztémákban (WU *et al.* 2011a). Saját vizsgálataink során a kiválasztott állatgyógyászati és neonikotinoid-típusú növényvédőszer-hatóanyagok egyedi és a formázott készítményeikben megtalálható adalékanyagaikkal együttes hatásait a GST-enzimaktivitásra nagy vízibolha (*Daphnia magna*) juvenilekben vizsgáltuk.

2.2. Szulfonamidok és a *trimethoprim* jellemzése és állatgyógyászati készítményekben történő felhasználása

A napjainkban is számos, hazánkban is engedélyezett humán- és állatgyógyászati készítmény aktív hatóanyagai, a szulfonamidok voltak a gyógyászatban elsőként alkalmazott antibakteriális hatóanyagok (PETRI 2006). Az antibiotikus hatású szulfonamidok [pl.

sulfadiazine, *sulfamethoxazole* (SMX)] a szulfanilamid különböző származékai, amelyek a kulcsfontosságú, a folsavat biológiailag aktív tetrahydro-foláttá alakító dihidropteroát-szintetáz enzim kompetitív inhibitorai. A tetrahydro-folát többek között a sejtfalat alkotó fehérje, valamint az RNS- és DNS-szintézis fontos eleme. Az emlősökkel ellentétben a baktériumok nem tudják hasznosítani az exogén folsavforrásokat, így a folsav szintézisének hiányában életképtelenné válnak (MACHOVICH 2006). A humán orvoslás mellett a szulfonamidok mezőgazdasági felhasználása is sokrétű, alkalmazzák méhészetekben, akvakultúrákban, az állattenyésztésben takarmányozási (növekedést serkentő) adalékanyagként, valamint az állatorvoslásban gyógyszeres előkeverékek (premixek) formájában, egyes betegségek (pl. aktinobacillózis) kezelésére vagy megelőzésére (BARAN *et al.* 2011, PORTER 2011). Az Antimikrobás Szerek Felhasználásának Európai Felügyelete (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*, ESAC) 2018-ban nyilvánosságra hozott jelentése alapján európai és hazai szinten is a penicillinek a legelterjedtebb antibiotikumok, azonban az egyéb, köztük a szulfonamidok felhasználása sem elhanyagolható mennyiségű (ECDC 2018). A gyógyászati készítményekben a szulfonamid-típusú hatóanyagok általában diamino-pirimidinekkel [*trimethoprim* (TRI)] kombinálva találhatók meg a két hatóanyagcsoport között fellépő szinergizmus miatt. A TRI hatóanyagot kezdetben antimaláriás szerként vizsgálták, azonban kiderült, hogy hatékonyan (az emlősökhöz képest akár tízezerszer nagyobb affinitással) gátolja a folsav szintézisét a baktériumokban, és szinergens hatású a szulfonamidokkal, ami előnyös a gyógyászatban történő felhasználása során (SEYDEL *et al.* 1972, ZINNER és MAYER 2015). Az SMX-TRI kombinációk széles spektrumú baktericidhatást biztosítanak, mivel a két hatóanyag különböző pontokon hat a baktériumok tetrahydro-folát szintézise során. Az általunk vizsgált szulfonamid-típusú és TRI hatóanyagok kémiai szerkezete a 3. melléklet I. táblázatában található meg.

A szulfonamidok és a TRI engedélyezett gyógyszerkészítményei kiszerelésüket tekintve többnyire oldatos injekciók, belsőleges porok/oldatok/paszták és gyógypremixek, amelyek számos állatfaj esetében (pl. szarvasmarha, kutya, ló) többféle kórkép (pl. légúti, ivarszervi és bőrfertőzések) kezelésére alkalmazhatók, akár a vemhesség és a laktáció idején is (NÉBIH 2021b). Az élelmiszertermelés céljából tartott állatok preventív vagy terápiás kezelését követően a megfelelő élelmezés-egészségügyi várakozási idő figyelmen kívül hagyása a hatóanyagok megjelenését eredményezheti az állati eredetű élelmiszerekben (pl. hús, tojás, tej). A meghatározott maximális szermaradék-határértéket [*maximum residue limit* (MRL)] meghaladó antibiotikum-szermaradékok különösen nagy közegészségügyi veszélyekkel járnak (SWANN 1969). Az EU-ban az állati eredetű élelmiszerekben megengedhető MRL-értékeket a 470/2009/EK rendelet szabályozza (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2009a).

Az állatgyógyászati hatóanyagok felszíni vizekben történő megjelenésére egyre nagyobb figyelem irányul. A felhasznált hatóanyagok a kezelt állatok ürítése során vagy a kezelt állattól származó trágya mezőgazdasági területekre történő kijuttatásával a legelőkre kerülhetnek, ahonnan a szulfonamidok alacsony szorpciós kapacitása miatt, a talajon keresztül gyorsan elérhetik a talajvíz szintjét és a felszíni vízbázisokat. A külsőleg alkalmazott készítmények hatóanyagai a fürdővízzel juthatnak a helyi csatornahálózatokba, majd az alacsony hatásfokú szennyvíztisztítás következtében bekerülhetnek a felszíni vizeinkbe és lassan az ivóvízbázisba (BOXALL *et al.* 2003, SUKUL és SPITELLER 2006). Európai folyók perzisztens poláros szennyezőinek vizsgálata során észak-nyugat-spanyolországi folyók vízmintáiban a leggyakoribb gyógyszermaradványok a *decoquate*, a *sulfamethazine*, a *sulfamethoxypyridazine* és a *TRI* voltak (IGLESIAS *et al.* 2014). A Duna romániai szakaszának vizsgálata során az *SMX* volt a leggyakoribb szennyező a vizsgált antibiotikus hatású vegyületek között, de a *TRI* is a minták több mint felében kimutatható volt (CHITESCU *et al.* 2015). A különböző tanulmányokban elérhető DT_{50} -értékek nagy variabilitást mutatnak bizonyos szulfonamid-típusú hatóanyagok esetében, amelynek elsődleges oka a vizsgált környezeti mátrix mikrobiális közösségének összetételében és aktivitásában megfigyelhető különbségekkel magyarázható. Bizonyos tanulmányokban – főleg, ahol standard módszerekkel (pl. ISO 11734:1995, OECD 301D) vizsgálják a szulfonamidok (pl. *SMX*) biodegradációját – gyakorlatilag nem tapasztalható a kiindulási vegyület koncentrációjának csökkenése. Más tanulmányokban azonban a szulfonamidok gyors lebomlásáról számolnak be (BARAN *et al.* 2011). Felszíni vizekben a direkt fotolízis, amely során kevésbé perzisztens bomlástermék (3-amino-5-metil-izoxazol) jön létre, korlátozza az *SMX* perzisztens jellegét, így a direkt fotolízis fontos szerepet játszik e hatóanyag felszíni vizekben történő lebomlásában (LAM és MABURY 2005).

A szulfonamidok toxicitását vizsgálták többek között különböző algafajok, békalencse, vízi gerinctelenek és halfajok esetében egyaránt (PARK és CHOI 2008, BIALK-BIELINSKA *et al.* 2013, JOHANSSON *et al.* 2014), továbbá igazolták a szulfonamidok és bizonyos nehézfémek között fellépő szinergens hatások kialakulását is (YU *et al.* 2014). A *TRI* esetében különböző tanulmányokban vizsgálták a vízi szervezetekre gyakorolt toxikus hatások kialakulását (DE LIGUORO *et al.* 2012) és *D. magna* tesztszervezeten vizsgálták multigenerációs hatásait is (BONA 2014), továbbá hal- ($EC_{50} = 671,8 \pm 21,8$ mg/l) és emlőssejtvonalakon ($EC_{50} = 611,6 \pm 20,4$ mg/l) igazolták genotoxikicitását (PAPIS *et al.* 2011).

2.3. Neonikotinoid-típusú hatóanyagok jellemzése és felhasználása a kémiai növényvédelemben

A neonikotinoid-típusú hatóanyagok – ahogy arra az elnevezésük is utal – hatásukban és kémiai szerkezetükben valamelyest a nikotinhoz hasonlító vegyületek. A nikotin természetes eredetű idegméreg (SÁNCHEZ-BAYO *et al.* 2013). A neonikotinoidok heterociklusos gyűrűjéhez, amelyet jellemzően egy 2-klór-piridil- vagy 2-klór-1,3-tiazo-csoport alkot, kapcsolódó farmakofór részlet alapján három csoportba sorolhatók: (i) N-nitro-guanidinek [pl. *clothianidin* (CLO), *imidacloprid* (IMI), *thiamethoxam* (TMX)], (ii) nitro-metilének (pl. *nitenpyram*), (iii) N-ciánamidok [pl. *acetamiprid* (ACE), *thiacloprid* (TCL)] (JESCHKE *et al.* 2011, GOULSON 2013). Az alapszerkezethez kapcsolódó további szubsztituensek jellege alapján további három osztályba csoportosíthatók: (a) öttagú gyűrűs szerkezet (pl. IMI, TCL), (b) hattagú gyűrűs szerkezet (pl. TMX), (c) nem ciklusos szerkezet (pl. ACE, CLO) (KRAMER és SCHIRMER 2007). Az általunk vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyagok kémiai szerkezete a 3. melléklet II. táblázatában található meg.

Az első kereskedelmi forgalomban kapható neonikotinoid-típusú hatóanyag az IMI az 1990-es évek elején került használatba (KOLLMEYER *et al.* 1999). Napjainkban a neonikotinoid-készítmények a legelterjedtebb felszívódó hatású rovarölők a világpiacon (SIMON-DELISO *et al.* 2015). 2014-ben a neonikotinoidok tették ki a globális növényvédőszerpiac több mint 25%-át. A neonikotinoidok felhasználásának 75%-a Latin-Amerikában, Ázsiában és Észak-Amerikában, 11%-a Európában valósult meg (BASS *et al.* 2015).

A neonikotinoid-típusú hatóanyagok az acetil-kolin agonistái a nikotinos acetil-kolin-receptorokon (de nem a muszkarinos acetil-kolin-receptorokon). Az acetil-kolinéhoz hasonló szerkezetük miatt, az ingerület továbbítása során az acetil-kolinnal versengve megkötődnek a nikotinos acetil-kolin-receptorokon elfoglalva a neurotranszmitter helyét a neuron posztzinaptikus membránjában, folyamatos ingerületkeltést eredményezve. A receptorokon való megkötődés a rovarok esetében irreverzibilis (BUCKINGHAM *et al.* 1997, ZHANG *et al.* 2000), így az ingerület továbbításának állandósulása (a lecsengés blokkolása) a rovar pusztulását eredményezi (TOMIZAWA és CASIDA 2005). A neonikotinoidok olyan széles hatásspektrumú, nem szelektív rovarölők (MORRISSEY *et al.* 2015), amelyek a növények gyökerén át a talajból vagy permetezést követően a levelek és más zöld lágyszövetek felületén keresztül felszívódnak, majd a növényi szállítószöveteken keresztül minden növényi szövetbe bekerülnek, így a növény minden része védetté válik a rovarkártevők ártalmaival szemben (BYRNE és TOSCANO 2006, BONMATIN *et al.* 2014). A neonikotinoid-készítmények kijuttatása és a növények kezelése különböző módokon történhet: legnagyobb részben különböző vetőmagok csávázószerként, de

használják talajfertőtlenítésre granulátumként, levélpermetként, faállományok esetében törzsbe injektálva, továbbá palánták bemeztetésére is (BYRNE *et al.* 2012, SIMON-DELISO *et al.* 2015). A kezelések során a hatóanyagokkal történő közvetlen kontaktus, továbbá azok elfogyasztása letális hatással bír a különböző szájszervekkel rendelkező és a talajban élő lárvaállapotú rovarkártevőkre (GUPTA és MILATOVIĆ 2014). Hatásmechanizmusuk miatt azonban káros hatást gyakorolnak a növényeket látogató és beporzó (pl. méhek, lepkék) nem célszervezetekre is. A toxikus hatást a neonikotinoid-permetecseppek és a szántóföldi növények szöveteiből kiválasztott guttációs cseppek közvetlen kontaktusa révén fejtik ki (GIROLAMI *et al.* 2009, MÖRTL *et al.* 2017, 2019, 2020), továbbá a pollen és nektár begyűjtésén keresztül, amely akár a kaptárak krónikus károsodását is eredményezheti. Beporzókra gyakorolt fokozott toxicitásuk következtében a neonikotinoid-tartalmú készítmények felhasználása szigorúan korlátozott az EU területén, ugyanis 2013-ban az EU közösségi szinten visszavonta vagy korlátozta bizonyos hatóanyagok (CLO, IMI, TMX) engedélyét, melynek következtében a kétszintű engedélyezés értelmében a tagországok saját hatáskörben szabályozták a készítmények felhasználását (EUROPEAN COMMISSION 2013a). A neonikotinoidok tudományos szakértői felülvizsgálatát követően (FRYDAY *et al.* 2015) a CLO, IMI, TMX hatóanyagok alkalmazása betiltásra került, de a korlátozások nem érintik a zárt üvegházban történő alkalmazásukat (EUROPEAN COMMISSION 2018a, 2018b, 2018c). Más neonikotinoid-típusú hatóanyagok, mint az ACE, amely méhveszélyessége még csak nem is jelölésköteles, valamint a TCL továbbra is felhasználhatók az EU területén (EUROPEAN COMMISSION 2018d, OCSKÓ *et al.* 2020). A jogi szigorítások hatására hazánkban 25 neonikotinoid-készítmény forgalomba hozatali és felhasználási engedélyei kerültek visszavonásra vagy módosításra, elsősorban a szabadföldi felhasználásokat illetően. A hazánkban jelenleg engedélyezett neonikotinoid-típusú készítmények a formuláció típusa alapján többnyire vízzoldható granulátumok, koncentrátumok, porok vagy olajalapú/vizes szuszpenziók. Az engedélyezett készítmények számos növényi kultúrában (pl. alma, burgonya) és számos kártevő (pl. levéltetvek, molyfélék) ellen felhasználhatók, azonban bizonyos készítmények csak zárt rendszerekben alkalmazhatók, a légi kijuttatásra vonatkozó korlátozások és az ún. Magas Természeti Értékű Területekre vonatkozó előírások figyelembevétele mellett (FVM 2009, NÉBIH 2021c).

A neonikotinoidok fizikokémiai tulajdonságaik (pl. vízzoldhatóság, bizonyos mértékű perzisztencia) és nem megfelelő növényvédelmi technológiák következtében felhalmozódhatnak a talajban (MÖRTL *et al.* 2016) és megjelenhetnek a felszíni vizekben, ahol káros hatást gyakorolhatnak az ott élő nem célszervezetekre (VEHOVSZKY *et al.* 2015, SÁNCHEZ-BAYO *et al.* 2016, MÖRTL *et al.* 2020). A neonikotinoid-típusú hatóanyagok terjedése a talajban és a talajvízben számos paramétertől függ (pl. szervesanyag-tartalom, pH) (MORRISSEY *et al.*

2015). Bizonyos hatóanyagok (pl. *ACE*) biodegradációja ismert a talajban (SÁNCHEZ-BAYO *et al.* 2013), azonban vízi környezetben semleges vagy savas pH mellett és anaerob körülmények között hidrolízissel szemben viszonylag ellenállóak (MORRISSEY *et al.* 2015). Tiszta vízben bizonyos neonikotinoid-típusú hatóanyagok (pl. *CLO*, *IMI*, *TMX*) gyors fotolitikus lebomlása következik be (CCME 2007, PENA *et al.* 2011), melynek eredményeként potenciálisan toxikus elsődleges és másodlagos metabolitok keletkezhetnek (GOULSON 2013). A neonikotinoidok környezeti koncentrációinak vizsgálata során egy amerikai kukoricaföld mellett begyűjtött felszínivízminták esetében a *CLO* minden mintában kimutatható volt, és koncentrációja elérte a 43,6 µg/l-t, továbbá 98,7%-os arányban igazolták a *TMX* jelenlétét, amelynek maximális koncentrációja 16,5 µg/l volt (ANDERSON *et al.* 2015, SCHAAFSMA *et al.* 2015). Hazai felszínivízminták nagy részében, habár a mennyiségi meghatározási határ alatt, de igazolható volt a neonikotinoidok, elsősorban a *TMX* és bomlástermékeként a *CLO* jelenléte, azonban a nyári időszakokban átmenetileg sekély víztestekben, esőzéseket követően a meghatározott koncentrációk 10–41 µg/l között alakultak (SZÉKÁCS *et al.* 2015).

A neonikotinoid-típusú hatóanyagok napjainkra ubikviter felszínivíz-szennyezőkké váltak, így számos kockázatot jelentenek a vízi szervezetekre, ugyanis változásokat idézhetnek elő az élőszervezetek fiziológiai paramétereiben és viselkedésében (BOWNIK *et al.* 2017, ZHANG és ZHAO 2017). A különböző neonikotinoid-típusú hatóanyagok vízi szervezetekre gyakorolt hatásait több tanulmányban vizsgálták különböző alga, vízi gerinctelen és hal tesztorganizmusokon (FINNEGAN *et al.* 2017, RABY *et al.* 2018). Az emlősök és más gerincesek kevésbé érzékenyek a neonikotinoid-típusú hatóanyagok toxikus hatásaival szemben, mivel a nikotinerg acetil-kolin-receptorok a rovarok idegrendszerében jóval nagyobb arányban vannak jelen, mint a gerincesekben (SIMON-DELISO *et al.* 2015).

2.4. A *glyphosate* jellemzése és felhasználása a kémiai növényvédelemben

A *glyphosate* [N-(foszfonometil)-glicin (*GLY*)] a glicin természetes aminosav foszfonometil-származéka, szerkezetét és megjelenési formáját tekintve kristályos, fehér, szagtalan, szilárd halmazállapotú vegyület, amely két savas funkciós csoporttal is rendelkezik: a karboxil- és a foszfonilcsoportokkal. Az egyértékű karboxilcsoport egyetlen disszociálható H^+ -ionnal rendelkezik, a háromértékű foszfonátcsoportól két H^+ -ion képes disszociálni (a harmadik csak szélsőségesen lúgos körülmények között) (DILL *et al.* 2010). A *GLY* kémiai szerkezetét a 3. melléklet III. táblázata mutatja be. A vegyületet 1950-ben Henri Martin állította elő, de gyomirtó hatására csak 1971-ben derült fény a Monsanto vizsgálatai során, melyet követően az első *GLY*-készítmény ROUNDUP néven 1974-ben került kereskedelmi forgalomba (DILL *et al.* 2010). A

nem szelektív hatású *GLY*-tartalmú készítményeket eredetileg szántóföldi kultúrák preemergens (kelés előtti) gyomirtására, ruderalis területek és csemetekertek gyommentesítésére használták (SZÉKÁCS 2006, DARVAS *et al.* 2011), így a készítmény kijuttatásának időbeni korlátozottsága jelentős hatást gyakorolt a *GLY* éves kijuttatási mennyiségeinek alakulására. A *GLY* hatóanyaggal szemben toleráns GM-növényfajták megjelenésével (az EU-ban nincs vetési engedélyük) lehetővé vált a posztemergens (kelés utáni) alkalmazás is, így a *GLY* felhasználásának mértéke az amerikai kontinensen jelentősen megemelkedett (GOWER *et al.* 2002), növelve a hatóanyag környezeti kockázatait. A napjainkban is világszinten piacvezető hatóanyag globális éves felhasználása kiemelkedő, 2014-ben elérte a 826 millió kg-ot (SZÉKÁCS és DARVAS 2012, 2018, BENBROOK 2016). 2012-ben a globális *GLY* piac kb. 17%-a valósult meg Európában (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH 2014).

A *GLY* hatásmechanizmusa alapján az aromás aminosavak (fenil-alanin, triptofán, tirozin) bioszintézisének gátlószerei közé tartozik. A *GLY* gátolja a növényekben lezajló sikiminsav-anyagcsereutat, amelynek következtében a növényeken a korai öregedés jelei és nekrotikus elváltozások alakulnak ki, majd a növény rövid időn belül elpusztul (SZÉKÁCS 2006). A *GLY* a foszfoenol-piruvát analógiaként képes bekötődni annak helyére, megakadályozva ezzel az aromás aminosavak bioszintézisének központi intermediere [az 5-enol-piruvil-sikiminsav-3-foszfát (*EPSP*)] kialakulását katalizáló enzim, az *EPSP*-szintetáz működését. A *GLY* által gátolt metabolikus út minden magasabb rendű növényben megtalálható, így alkalmazása minden szárazföldi és vízi növényi szervezet elhalását eredményezi (BOOCOCK és COGGINS 1983). A növényvédelemben a *GLY* sóit (pl. *GLY*-izopropilammónium-só, *GLY*-IPA; -diammóniumsó; -trimetil-szulfóniumsó) használják fel aktív hatóanyagként, a hatóanyag vízben való oldhatóságának fokozása érdekében (SZÉKÁCS 2006, DEFARGE *et al.* 2016, TRAVLOS *et al.* 2017), megtartva annak gyomirtó tulajdonságait. A különböző *GLY* formák vízzoldhatóságának sorrendje a vízben legkevésbé oldható felől indulva a következő: *GLY* szabad sav, *GLY*-ammóniumsó, -nátriumsó, -káliumsó, -IPA-só, -trimetil-szulfóniumsó (TSUI és CHU 2003, SZÉKÁCS és DARVAS 2018).

A *GLY*-tartalmú készítményeket a szántóföldi növénytermesztésben a gyomirtáson kívül állományszárításra (deszikkálásra) is alkalmazzák, amellyel a növény betakaríthatóságának időpontja előbbre hozható és a pótlólagosan, szárításra használt energiamennyiség csökkenthető (WHIGHAM és STOLLER 1978), továbbá felhasználják nem mezőgazdasági művelés alatt álló területek (pl. sínpályák) gyommentesítése során is (BENBROOK 2016). A hazánkban érvényes engedéllyel rendelkező, a *GLY* különböző formáit (pl. *GLY*-IPA-, -kálium-, -diammóniumsó) tartalmazó készítmények a formuláció típusa alapján többnyire folyékony vízzoldható koncentrátumok és vízzoldható vagy vízben diszpergálódó granulátumok. Az engedélyezett

készítmények számos növényi kultúrában (pl. napraforgó, repce, szója) alkalmazhatók az összes évelő, nem évelő, egy- és kétszikű gyom ellen, továbbá totális gyom- és sarjirtásra, valamint állományszárításra, a légi kijuttatásra vonatkozó korlátozások és az ún. Magas Természeti Értékű Területekre vonatkozó előírások figyelembevételével (FVM 2009, NÉBIH 2021c).

A GLY amfoter jellegű vegyület, így egyszerre rendelkezik savas és bázikus tulajdonságokkal, ezért vízdoldhatósága kiváló, s a különböző környezeti mintákból történő kimutatása nehézkes (BOTERO-COY *et al.* 2013). Természetes körülmények között a GLY felezési ideje (DT_{50}) nagymértékben függ a különböző környezeti tényezőktől (pl. hőmérséklet, mikrobiális aktivitás, fémionok jelenléte) (DARVAS *et al.* 2011). Elsődleges bomlásterméke az amino-metil-foszfonsav (AMPA), a kiindulási vegyületnél sokkal mobilisabb, ezért fokozott terhelést gyakorolhat környezetünkre (DUKE és POWLES 2008). A GLY talajba kerülve a fémionokkal komplexet képez, amely a csapadékkal könnyen a mélyebb talajrétegekbe és a talajvízbe mosódhat (VERECKEN 2005). A GLY felszíni vizekben való megjelenése mára globálisan tapasztalható jelenséggé vált. Az ausztrál, ázsiai és amerikai földrészekén a felszíni vizekben megjelenő GLY-tartalom átlagos értéke kb. 150 µg/l, de ahol a GLY-tűrő GM-növények termesztése, valamint a GLY-tartalmú készítmények állományszárításra való felhasználása jelentős mértékű, a GLY koncentrációja elérheti akár az 5 mg/l-es nagyságrendet is (EDWARDS *et al.* 1980, COUPE *et al.* 2012, MARDIANA-JANSAR és ISMAIL 2014, SZÉKÁCS és DARVAS 2018), főként a kezelt területek melletti vízfolyásokban és nagyobb esőzéseket követően. Az európai felszínivízmintákban meghatározott GLY-tartalom sok esetben elérte a 4 µg/l-t (KJAER *et al.* 2005, HANKE *et al.* 2010), amely jelentős mértékben átlépi az EU-ban növényvédő szerekre vonatkozó megengedhető szennyezettségi határértéket (0,1 µg/l) (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 1998). A hazánkban mért GLY-szint a felszíni vizek esetében (540–980 ng/l) (MÖRTL *et al.* 2013, SZÉKÁCS *et al.* 2015), jelenleg az EU-ban még elfogadható szint alatt marad, azonban a GLY-tűrő GM-fajták európai engedélyezése a felszíni vizek GLY-szennyezettségének megemelkedéséhez vezetne.

A GLY és formázott készítményei vízi szervezetekre gyakorolt hatásait számos tanulmányban vizsgálták különböző fejlettségi szinteken, többek között különböző algafajokon (*Prymnesium parvum*, *Scenedesmus quadricauda*) (WONG 2000, DABNEY és PATINO 2018), nagy vízibolhán (*D. magna*) (RENO *et al.* 2018), árvaszúnyoglárvaikon (*Chironomus plumosus*) (FOLMAR *et al.* 1979), különböző puhatestű- (IUMMATO *et al.* 2018), hal- (FIORINO *et al.* 2018) és békafajokon, ahol az ebihalak igen érzékenyen reagáltak a GLY kezelésre (3 mg/l-től) (BACH *et al.* 2018). A GLY teratogén (CARRASCO 2013), genotoxikus (TOWNSEND *et al.* 2017), citotoxikus (MESNAGE *et al.* 2013a, 2013b, TÓTH *et al.* 2020), hormonmoduláns (DEFARGE *et al.* 2016, MESNAGE és ANTONIOU 2017), valamint máj- és vesekárosító

(LARSEN *et al.* 2012) hatásait több kutatócsoport is igazolta különböző gerinctelen és gerinces tesztorganizmusokon, továbbá különböző sejtvonalakon.

2.5. A felületaktív anyagok jellemzése és szerepe az állatgyógyászati és növényvédőszer-készítményekben

Az állatgyógyászatban és a kémiai növényvédelemben felhasznált készítmények az aktív hatóanyagaikon kívül különböző adalékanyagokat is tartalmaznak. A készítményekben megtalálható adalékanyagok egyik fő csoportját a formázóanyagok képezik, amelyeket különböző szempontok alapján (pl. tulajdonságaik és funkciójuk) csoportosíthatjuk. A formázóanyagokat funkciójuk alapján csoportosítva, a felületaktív anyagok (detergensek) alkotják a legfontosabb csoportot, melyek közé tartoznak az emulgátorok, diszpergálószeres és nedvesítőszeres. A kiegészítő funkciót megtestesítő vivőanyagok halmazát a folyékony oldószeres és a szilárd hordozóanyagok alkotják. A formázószeres további csoportjait többek között a kémiai identitás megőrzését biztosító stabilizálószeres, antioxidánsok és konzerválószeres alkotják (TU és RANDALL 2001). A formázóanyagokon belül adjuvánsnak nevezzük azokat az adalékokat, amelyek elsődleges célja, hogy fokozzák a készítmény hatékonyságát és biológiai hozzáférhetőségét, azáltal, hogy növelik az oldhatóságot, adszorpciót és a hatóanyag felszívódását (BURAKOVA *et al.* 2017). A további adalékanyag-csoportok (pl. festékanyagok, szaganyagok riasztóanyagként segítik elő a biztonságos felhasználást) alkalmazása elsősorban a felhasználáshoz és a kijuttatáshoz köthető, így közvetlenül nem befolyásolják a készítmény hatékonyságát (FOY 1987, DE ALMEIDA *et al.* 2010).

A felületaktív anyagok ipari (pl. kozmetikumok, tisztítószeres, kőolajtermékek) és háztartásbeli (pl. mosó-, mosogató-, tisztítószeres) alkalmazása mellett kiemelt figyelmet kell fordítani azok állatgyógyászati és mezőgazdasági felhasználására is. A felületaktív anyagok globális piaca 2016-ban megközelítőleg 35 milliárd dollár bevételt jelentett a gyártók számára, amelyből a növényvédelmi célú felhasználásra szánt detergensek piaca meghaladta az 1,4 millió dollárt (KUMAR 2018). A világ éves felületaktívanyag-felhasználása 2018-ban meghaladta a 16 millió Mt értéket. Európában a globális fogyasztás 25%-a valósult meg, amely 3%-kal csökkent 2015 óta (IHS MARKIT 2018). A felületaktív anyagok sajátos kémiai szerkezetüknek köszönhetően hidrofób és hidrofíl részeket egyaránt tartalmaznak, vagyis egyszerre rendelkeznek zsír- és vízdékony részekkel (DI CORCIA 1998). A felületaktív anyagok csoportosítása általában a hidrofíl rész természete alapján történik, ennek megfelelően megkülönböztethetünk anionos, kationos, nem ionos és amfoter detergenseket (KROGH *et al.* 2003).

Az állatgyógyászatban alkalmazott felületaktív anyagokat fertőtlenítőszerként, felületi tisztítószerként és az állatok fürösztésére alkalmas szerekként használják fel. A készítményekben adjuvánsként alkalmazott formázószerrek elősegítik a gyógyszerhatóanyagok oldódását, erősítik a membránok permeabilitását és fluiditását, meghosszabbítják a hatóanyagok tartózkodási idejét a gasztrointesztinális rendszerben, továbbá megvédik a hatóanyagokat a bélüregében történő enzimatis (luminális) lebontástól és metabolizmustól a bélfalban (FOSTER 1998, KLINK *et al.* 1998). A különböző poláros vegyületek biológiai hozzáférhetősége az oldhatósági jellemzők befolyásolása nélkül fokozható abszorpciófokozó segédanyagok alkalmazásával (MURANISHI 1990, SWENSON és CURATOLO 1992). A vakcinákban alkalmazott detergenssek növelik az antigének immunogenitását, így nagymértékben hozzájárulnak az immunválasz kialakításához (MCEL RATH 1995), továbbá a vizes és olajos fázisok elkülönülését leggyakrabban nem ionos detergenssek (pl. nonil-fenol-etoxilát) alkalmazásával akadályozzák meg (TÓTH *et al.* 2016).

A különböző, növényvédő szerekben felhasznált felületaktív anyagok elsődleges célja, hogy fokozzák a készítmény hatékonyságát és biológiai hozzáférhetőségét azáltal, hogy növelik az aktív hatóanyag vízoldhatóságát és felvehetőségét, fokozzák a hatóanyag adszorpciós képességét, környezeti stabilitását és biológiai hatását, továbbá elősegítik a hatóanyag penetrációját, ezzel növelve a növényvédelmi kezelés hatékonyságát (BROZE 1999, CASTRO *et al.* 2014). Emellett növényvédő szereknél is alkalmaznak figyelmeztető festékanyagokat adalékanyagként. A lineáris alkil-benzol-szulfonátok (LAS) az anionos detergensseknek a világon a legnagyobb mennyiségben előállított csoportja, amelyet jelentős mértékben használnak fel adjuvánsként a növényvédőszer-készítményekben (CORADA-FERNÁNDEZ *et al.* 2018). A nem ionos poliéter-metil-sziloxánokat is gyakran alkalmazzák a különböző növényvédőszer-készítmények formázásában során, ugyanis hidrophil tulajdonságuknak köszönhetően nagymértékben növelik a készítmény csapadék általi lemosódással szembeni ellenálló képességét, így fokozzák az aktív hatóanyag aktivitását és hatékonyságát (KNOCHE 1994, VENZMER 2011). A nem ionos detergenssek közül előszeretettel alkalmazzák továbbá többek között az alkil-poliglükózidokat (APG), a polietoxilált aminokat és a szekunder alkohol-etoxilát vegyületeket is növényvédőszer-készítmények formázása során (LEMING 2009). A növényvédő szerekben az APG-vegyületeket elsősorban a víz felületi feszültségének csökkentésére alkalmazzák, mivel alacsony koncentrációban micellákat, míg magasabb koncentrációkban liotróp folyadékkristályokat képez (SULEK *et al.* 2013). A polietoxilált amin-típusú detergenssek kémiai szerkezete általában állati (pl. faggyú) vagy növényi (pl. kókuszolaj) eredetű lipidalapú aminból és etilén-oxid-oligomerból tevődik össze, ahol az etilénoxidláncok hossza eltérő lehet. A detergenscsoport legfőbb képviselői a polietoxilált faggyúaminok, amelyek egy állati eredetű faggyúzsírsavamin molekularészből és két, ismétlődő etilén-oxid-egységekből álló láncból

tevődnek össze (EFSA 2005, MESNAGE *et al.* 2019). A faggyúamin molekularész palmitinsavból, sztearinsavból és olajsavból származó aminokból és egyéb kisebb komponensekből álló keverék (LAWRENCE 1994, TUSH *et al.* 2013, MESNAGE *et al.* 2019), amely a növényi részek felületén átjárhatóvá teszi a viaszos kutikulát, ezzel elősegítve a hatóanyagok penetrációját a növényi szövetek belsejébe (GIESY *et al.* 2000).

A polietoxilált faggyúaminok rövidítése a szakirodalomban nem egységes: történhet a molekularészek külön-külön feltüntetésével, a polietoxilált alkilamin szerkezet jelzésével vagy a kétféle rövidítés kombinációjaként. A leghatározottabb – és a vonatkozó növényvédő szerek szakirodalomban a közelmúltban megjelent – elnevezés „*POE*” rövidítéssel jelzi a polietoxilált kémiai jelleget, és ehhez kapcsolódhat az amin eredetének (faggyú, lipid) és/vagy a szénlánc hossz megjelölése. Ezen rövidítés szerint az átlagosan 15 szénatomos (pentadékan) hosszúságú alkiláncot tartalmazó, faggyúeredetű polietoxilált amin rövidítése „*POE 15 faggyúamin*”. Emellett a szakirodalomban legáltalánosabb – korábbi – rövidítés a polietoxilált faggyúaminokra (a lánc hossz jelölése nélkül) *POEA*, mely rövidítés nem veszi tekintetbe, hogy a polietoxilált aminok nemcsak faggyúeredetűek lehetnek. Bár az előbbi rövidítéstípus szabatosabb, a dolgozatomban mégis az utóbbi rövidítést használom, tekintettel arra, hogy munkámban kizárólag faggyúalapú származékkal dolgoztam, illetve, hogy valamennyi közleményünkben a régebbi, *POEA* alakot szerepeltettük.

Az állatgyógyászati és növényvédőszer-készítményekben megtalálható különböző adalékanyagokat (pl. felületaktív anyagokat) korábban inaktív komponenseknek minősítették a készítmény biológiai főhatásának szempontjából. Az utóbbi években azonban számos tanulmányban igazolták a formázószer magas önálló toxicitását, valamint az aktív hatóanyag(ok) és az adalékanyagok együttes fokozott toxicitását, többek között a *GLY* és a formázott készítményeinek előállítása során felhasznált *POEA* esetében is (TSUI és CHU 2003, MESNAGE *et al.* 2014). A *POEA* formázóanyagként való alkalmazása *GLY*-tartalmú készítményekben az EU hatályos jogi szabályozásának értelmében betiltásra került (EUROPEAN COMMISSION 2016). A felületaktív anyagok jelentős mértékű előállításának és felhasználásának következtében a detergens és metabolitjaik, továbbá bomlástermékeik a különböző mezőgazdasági, ipari és háztartási felhasználásuk nyomán könnyen megjelenhetnek a különböző környezeti elemekben, így többek között a felszíni vizekben, a talajban, az üledékben és akár az ivóvízben is (KNEPPER és BERNA 2003, BERGÉ *et al.* 2018), így a vízi szervezetekre és közösségekre gyakorolt hatások vizsgálata kiemelt jelentőségű.

2.6. A tesztek során felhasznált vízi szervezetek és életközösségek jellemzése és alkalmazása az ökotoxikológiában

2.6.1. A nagy vízibolha (*Daphnia magna*)

A nagy vízibolha (*Daphnia magna* Straus, 1820) rendszertanilag az ágascsapú rákok (*Cladocera*) rendjébe, a levéllábú rákok (*Branchiopoda*) osztályába és az ízeltlábúak (*Arthropoda*) törzsébe tartozó elsősorban algákat fogyasztó vízi gerinctelen szervezet. Természetes előfordulását tekintve édesvízi állóvizekben igen gyakori faj, de brakkvizekben (fésős) is előfordulhat. A nagy vízibolha esetében az ivartalan (szűznemzés) és az ivaros szaporodási forma is ismert (KRISKA 2004, EBERT 2005, VANOVERBEKE *et al.* 2007).

A nagy vízibolha napjainkban is előszeretettel és nagy gyakorisággal alkalmazott vízi tesztszervezet az ökotoxikológiai vizsgálatok során, mivel laboratóriumban könnyen tartható és szaporítható rövid generációs idejű faj, továbbá szűznemzéssel való szaporodásának genetikailag viszonylag egyöntetű populációk állnak rendelkezésre a vizsgálatok során (LEWIS és WEBER 1985). Átlátszó kültakarójának köszönhetően belső anatómiai felépítése és az esetleges elváltozások mikroszkóp alatt könnyen vizsgálhatók. A *D. magna* olyan szűrőgető zooplankton, amely elsődleges fogyasztóként fontos szerepet játszik az édesvízi táplálékláncokban, továbbá rendkívül érzékeny a vízminőségben bekövetkező változásokra, így kiváló indikátor fajként és tesztszervezetként szolgál a vízi élőhelyekre kerülő vegyi anyagok, mint a különböző állatgyógyászati és növényvédőszer-készítményekben megtalálható ható- és adalékanyagok potenciális toxikus hatásainak vizsgálata és értékelése során (HAYASAKA *et al.* 2012). A *D. magna* gyakran alkalmazott tesztszervezet számos ökotoxikológiai standard [pl. akut immobilizációs (OECD 2004), reprodukciós (ASTM 2004, OECD 2012)] és nem standardizált [pl. szívritmus mérése (VILLEGAS-NAVARRO *et al.* 2003), viselkedési vizsgálatokban (REN *et al.* 2009), biokémiai biomarkerek (pl. enzimaktivitás) meghatározásában (GUILHERMINO *et al.* 1996, BARATA *et al.* 2005)] is. A toxicitásvizsgálatokban a rákfélék érzékenységeiben esetenként jelentős különbségek figyelhetők meg a hasonló táplálkozási stratégia és életmód ellenére, még a rendszertanilag egymáshoz közel álló fajok esetében is (pl. *D. magna*, *Ceriodaphnia dubia* és *Daphnia pulex*) (HAYASAKA *et al.* 2013, TOUMI *et al.* 2015).

2.6.2. Az algák jellemzése, különös tekintettel a cianobaktériumokra és a zöldalgafajokra

A felszíni vizekben megtalálható algák rendszertanilag prokarióta és számos eukarióta törzset (divíziót) magába foglaló, fotoszintézist folytató élőlénycsoport. Az algák osztályozása

többek között a fotoszintetikus pigmentek (pl. klorofill-a, -b, -c, karotinoidok) összetétele, a fotoszintézis eredményeképpen keletkező tartaléktápanyagok jelenléte, a morfológia, vagyis a testszerveződés jellege (pl. monadális-, rizopodiális-, kokkális alakok), mikro- és ultrastrukturális elemek, továbbá az ostorok mikroszkópos szerkezete alapján történik (KISS 1998, GRAHAM és WILCOX 2000). A fotoszintetizáló algafajok elsődleges termelőként kiemelt jelentőségűek a vízi ökoszisztémákban, az oxigéntermelésében, továbbá a természetes vizek tisztulási folyamataiban. Életmódjukat tekintve lehetnek planktonikus (lebegő életmódot folytató fitoplankton) vagy bentonikus (rögzült életmódot folytató perifiton) fajok, továbbá egy kis részük a neuszton tagjai (a víz-levegő fázishatárok felületén élők). Az ún. endozoikus életmódot folytató algacsoportok elsődlegesen olyan élő szervezetekben fordulnak elő, mint például egyes protozoonok és puhatestűek, azonban endoszimbiontaként növényi szervezetekben (pl. mohafélék) is megtalálhatók. Az algák testfelépítése az egysejtű, kolóniás, fonalas, lemezszerű felépítéstől akár a bonyolultabb már-már gyökér-, szár-, levélszerű képleteket mutató testfelépítésig terjed. A különböző algafajok esetében az ivaros és vegetatív szaporodási forma egyaránt előfordulhat (BOLD és WYNNE 1985, ÁCS *et al.* 2006, GUIRY 2012).

A cianobaktériumok (*Cyanobacteria*-fajok, kékalgafajok) a prokarióták közé tartozó, a fő fotoszintetikus pigmentek közül klorofill-a-t (néhány nemzetségük klorofill-b-t is) tartalmazó fajok (GRAHAM és WILCOX 2000). A cianobaktériumok felépítésüket tekintve egysejtűek (pl. *Cyanothece major*), kolóniát alkotók (pl. *Microcystis aeruginosa*) vagy fonalasak (pl. *Anabaena flos-aquae*) lehetnek. A cianobaktériumok színe a kékeszöldtől az ibolyáig terjed, esetenként vörösek vagy zöldek, pigmentösszetételüknek megfelelően (zöld: klorofill-a, kék: fikocián, allofikocián, vörös: fikoeritrin). A cianobaktériumok életmódjukat tekintve lehetnek bentikusak vagy planktonikusak, emellett csak vegetatív szaporodásuk ismert (STANIER és COHEN-BAZIRE 1977). A környezetvédelmi szempontból igen jelentős gondot előidéző vízvirágzások kialakulásáért számos, elsősorban gázvakuóllummal rendelkező cianobaktérium (pl. *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*) tömeges elszaporodása a felelős, amelyek közül több faj toxikus hatású, az általuk termelt toxinok jelenléte miatt (PAERL és OTTEN 2013).

Az eukarióta algák közé, továbbá a *Chlorophyta*-törzsbe tartozó zöldalgafajok élénkzöld színéért a klorofill-a és -b fotoszintetikus pigmentek a felelősek, amelyek színét nem fedik el a kiegészítő pigmentek (pl. lutein, zeaxantin, neoxantin) (KUMAR és SINGH 1979, KISS 1998, ÁCS és KISS 2007). A zöldalgák törzsének becsült fajszáma kb. 13 000-re tehető (GUIRY 2012). A zöldalgafajok esetében a vegetatív és ivaros szaporodás egyaránt megfigyelhető (NASELLI-FLORES és BARONE 2009). A felszíni vizek zöldalgaközösségei nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a vízi ökoszisztémákban, továbbá bizonyos fajok (pl. *Ankistrodesmus fulcatus*) részt vehetnek szerves szennyezők és toxikus vegyületek lebontásában (pl. tributil-ón)

(MAGUIRE *et al.* 1984). Jól alkalmazhatók a biológiai vízminősítés során, azonban bizonyos fonalas zöldalgafajok (pl. *Pleodorina indica*) tömeges elszaporodása szintén a felszíni vizek vízminőségének romlását idézi elő (WATSON *et al.* 2015).

A vízi ökoszisztémákban az algafajok alkotják a vízi ökológiai rendszerek elsődleges termelő szintjét és a biomassza legnagyobb hányadát, továbbá kulcsszerepet töltenek be a vizek és a légkör oxigénkörforgásában, a vízi táplálékhálózatokban, a tápanyagtranszport-folyamatokban, továbbá kiváló indikátor szervezetei a természetes vizek minőségi változásainak (SCHAFFER és SEBETICH 2004, JYOTHI *et al.* 2016). A kémiai növényvédelem során kijuttatott herbicidkészítmények algafajokra gyakorolt hatásainak vizsgálata elengedhetetlen a gyomirtó szerek toxikológia értékelése során. A különböző algafajokat széles körben alkalmazzák környezeti biológiai monitorozási vizsgálatok (WU *et al.* 2017), bioremediációs tevékenységek (VIDYASHANKAR és RAVISHANKAR 2016) és az ökotoxikológiai vizsgálatok során, mivel a különböző törzsek laboratóriumi körülmények között történő fenntartása és szaporítása könnyen kivitelezhető, gyors szaporodási és életciklus jellemzi őket, továbbá mintavételezésük egyszerűen megoldható (STEVENSON és LOWE 1986, MCCORMICK és CAIRNS 1994). A nagy vízibolhához hasonlóan az algafajok (pl. *Pseudokirchneriella subcapitata*) is gyakran alkalmazott tesztorganizmusok standard [pl. algaszaporodás-gátlási teszt (ASTM 1991, OECD 2006)] és nem standardizált [pl. fotoszintetikus aktivitás vizsgálata (BASHIR és CHO 2016), teratogén hatások vizsgálata (DZIENGO-CZAJA *et al.* 2008), genotoxicitás (MARTINEZ *et al.* 2015) és bioakkumulációs tesztek (XU és HUANG 2017)] vizsgálatokban. Az algák bizonyos fajai igen érzékenyek a különböző szerves szennyezők (pl. növényvédő szerek, bizonyos nehézfémek) toxikus hatásaira (SUROSZ és PALINSKA 2005), azonban az algafajok érzékenységeiben még azonos taxonokon belül is jelentős mértékű eltérések figyelhetők meg (MA *et al.* 2005).

A fotoszintetikus aktivitás gyakran alkalmazott mérési végpont a fitotoxikus hatások vizsgálata során, mivel mérése lehetővé teszi a káros hatások kialakulásának nem invazív, gyors indikációját. Széles körben alkalmazott módszer a gerjesztett klorofill-a-fluoreszcencia detektálása, melynek mérési elve a legtöbb esetben az ún. „Kautsky-effektuson” alapszik (KAUTSKY és HIRSCH 1931). Sötét körülmények között a növényi sejtekben átmenetileg megszűnik a fotoszintézis fotokémiai folyamata, majd a hirtelen nagyintenzitású, általában lézeres gerjesztés hatására a sejtek klorofillmolekulái a fényt azonnal abszorbeálni kezdik. A fotoszintézis optimális feltételei azonban csak lassabban alakulnak ki, így az eleinte elnyelt fény energiájának csak kisebb hányada hasznosul a fotoszintézis folyamatában. A felesleges fényenergiát a sejtek fluoreszcens fény formájában visszasugározzák. Néhány perc elteltével, ahogy a fotoszintézis folyamata feléled, az elnyelt fényt nagyobb hatásfokkal hasznosítja a

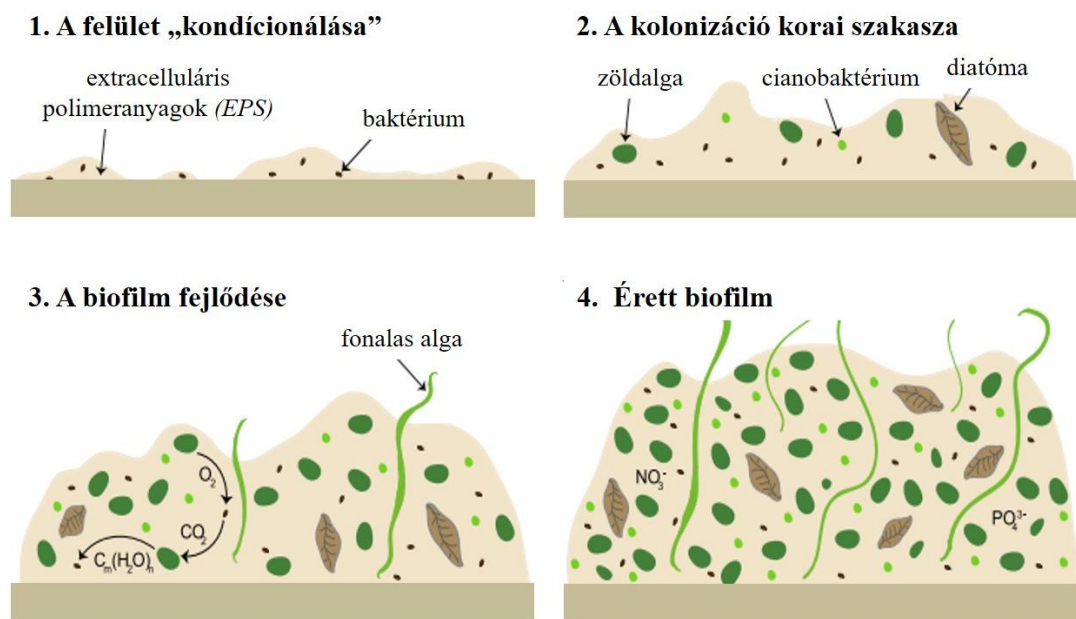
növényi sejt, így a fluoreszcens sugárzás intenzitása fokozatosan lecsökken, majd egy alacsonyabb értéken állandósul. A „Kautsky-effektus” időbeli lefolyását (kinetikáját) vizsgáló fluorométereket napjainkban igen széles körben alkalmazzák a fotoszintézis és a növényi szervezeteket érő stresszhatások kutatása során, továbbá a növények fiziológiás állapotának jellemzésére (KRAUSE és WEIS 1984, BARÓCSI *et al.* 2000, LENK *et al.* 2016).

2.6.3. Felszíni vizekben kialakuló biofilmközösségek

Marschall definíciója alapján a mikrobiális biofilm az anyag felületén immobilizálódott mikroorganizmusok közössége, rendszerint bakteriális eredetű szerves polimermátrixba [*extracellular polymeric substance (EPS)*] ágyazva. A biofilmek vizes környezetben, olyan ubikviter elterjedésű közösségek, amelyek térben és időben nem egyenletesek, és idegen eredetű szerves és szervetlen anyagokat egyaránt tartalmazhatnak. Az így jellemzett *klasszikus* biofilmközösségek kialakulásához általában 2–4 hét szükséges (MARSHALL 1992). A felszíni vizekben kialakuló biofilmek elsősorban a vizek fotolitikus felszínhez közeli rétegeiben, természetes vagy mesterséges víz alatti szubsztrátok (hordozó felület, aljzatok) felületén alakulnak ki. A biofilmek kialakulását és fejlődését számos abiotikus tényező befolyásolja (pl. fény, áramlási sebesség) (ROMANÍ 2009, PRIETRO *et al.* 2016). A vizes közegbe merített szilárd anyagok felületén makromolekulák és kis molekulatömegű, hidrofób molekulák tapadnak meg, mely szerves anyagok kondicionálják a szubsztrát felületét. A felület fizikai-kémiai tulajdonságai megváltoznak (pl. a felület töltése, szabad energiája és víztaszító képessége) és ún. „kondicionáló film” alakul ki (1. ábra) (MARSHALL 1992).

A felület tulajdonságainak megváltozása a mikrobák reverzibilis adhézióját teszi lehetővé, amelyet a sejtfelszín és a szubsztrát felszíne közötti vonzó vagy taszító erők (pl. Van der Waals-féle és elektrosztatikus erők, hidrofíl/hidrofób kölcsönhatások) határoznak meg. A sejtek felszínén megtalálható képletek (pl. flagellum, fimbria) jelentős mértékben elősegítik a felületen történő megkötődést (JONES és ISAACSON 1983). A fejlődési folyamat előre haladásával a sejtek felülethez való kötődése irreverzibilissé válik, amely különböző kémiai reakciók és a biokémiai viszonyok megváltozásának eredménye (pl. hidrogénhidas, ionos és kovalens kötések). A sejtek adaptálódnak a kötött fenotípushoz, és szaporodásnak indulnak. Megindul az *EPS* termelése, és olyan változások következnek be az anyagcserében, amelyek a sejt-sejt közötti kölcsönhatásokat erősítik, majd kialakul a sejtek közötti kommunikációs jelátvitel és a víz és a tápanyagok diffúzióját elősegítő csatornahálózat (SAUER *et al.* 2007). Az *EPS* kialakulását követően a biofilmekben megjelennek az algasejtek, és gyors szaporodásnak indulnak (1. ábra) (MACK és ANDERSON 1975). A biofilmek mikrokörnyezetében kialakuló

tápanyaghiány és a felhalmozódó anyagcseretermékek következtében a biofilm növekedése idővel korlátozottá válik. A biofilmek különböző biológiai, fizikai és kémiai hatások (pl. áramlás sebességének megváltozása, turbulens áramlás, a biofilmek kémiai szerekekkel történő kezelése) és fiziológiás tulajdonságok (a sejtek olyan enzimeket kezdenek termelni, amelyek lazítják az *EPS* összetételét) hatására diszpergálódhatnak. Bizonyos fajok újra planktonikussá válhatnak, továbbá kisebb mikrokolóniák válhatnak le, amelyek újabb felületeken megtapadva biztosítják a biofilmek terjedését (MARSHALL 1992, GARRETT *et al.* 2008).



1. ábra A biofilmek kialakulásának fázisai (SCHNURR és ALLEN 2015)

A felszíni vizek biofilmközösségeit főképp olyan fotoautotróf (pl. algák – cianobaktériumok, zöldalga- és kovaalga-fajok) és heterotróf (pl. baktériumok, gombák és protozoa-fajok) mikroorganizmusok alkotják (10–25%), amelyek az elsősorban a bakteriális közösség által kiválasztott *EPS*-mátrixba (75–90%) ágyazódva helyezkednek el a biofilmen belül (CHARACKLIS és MARSHALL 1990, LOCK 1993). A főleg fehérjéket (1–60%), poliszacharidokat (40–95%), lipideket (1–40%) és nukleinsavakat (1–10%) tartalmazó *EPS* olyan dinamikus rendszer, amely meghatározza a biofilmek morfológiáját, szerkezetét és a biofilmek mechanikai stabilitását (LEWANDOWSKI *et al.* 1994, ZHANG *et al.* 2015). Az *EPS* továbbá fontos szerepet tölt be a mikroorganizmusokat érő fiziko-kémiai hatások (pl. kiszáradás, kémiai fertőtlenítés, mechanikus tisztítás) elleni védekezésben (WINGENDER *et al.* 1999, RAMASAMY és ZHANG 2005), a szerves és szervetlen molekulák megkötésében (BRYERS 1984, FREEMAN *et al.* 1995) és a biofilmközösség felületén történő megkötődésében (COSTERTON *et al.* 1995, JIA *et al.* 2017). Ugyanakkor az *EPS* szorpciós kötőhelyként

szolgálhat többek között a toxikus szennyezők (pl. klór-fenolok, *PAH*-vegyületek, *atrazine*) számára is, de szorpciós képességét jelentős mértékben befolyásolja a víz pH-értéke és az *EPS* fizikai állaga (oldott, szol és gél állapot) (LAWRENCE *et al.* 2001, SUTHERLAND 2001). Az *EPS* összetételét befolyásolja a felületen megtelepedő mikroorganizmusok fajtája, a biofilm kora és a különböző környezeti tényezők (pl. hőmérséklet, pH, tápanyagtartalom) (LI *et al.* 2001).

A felülethez kötött baktériumközösségeket jelentősen befolyásolja az algaközösség adhéziója, a szervesanyagok mennyisége és az algavirágzás jelensége (BESEMER *et al.* 2005). Az édesvízi biofilmekben kedvező fényviszonyok mellett az algafajok és az *EPS* képezik a biofilmek biomasszájának jelentős részét (ZIPPEL és NEU 2005, SCHNURR és ALLEN 2015), ugyanis a fény és a szervesanyagok (pl. nitrát és foszfát) megemelkedett szintje pozitív hatással van az algák növekedésére a biofilmekben (HILL 1996). A biofilmek algaközösségeinek biomasszáját nagymértékben befolyásolják az áramlási körülmények, a hidrológiai változások és a vízhőmérséklet (BATTIN *et al.* 2003). A különböző mikroorganizmusok számára a felülethez való kötöttség számos előnnyel jár. A biofilmekben a tápanyagok közös mobilizációja, így jobb tápanyagellátás valósul meg a közösség tagjai között, továbbá a felülethez történő kötődés nagyobb védelmet biztosít a környezeti hatásokkal szemben. A biocidekkel szembeni védelem és a biofilmközösség tagjai közötti genetikai információcsere lehetősége fokozottá válik (MARSHALL 1992, JELENIK-NIKOLICS és LÉVAI 2000). A biofilmek fontos szerepet játszanak biogeokémiai ciklusokban és a természetes vizekben megtalálható szennyezőanyagok biológiai lebontásában (SCHORER és EISELE 1997, LEAR 2016). Pozitív hatást gyakorolnak a felszíni vizek öntisztulási képességére (CAZELLES *et al.* 1991), valamint táplálékforrásként szolgálnak a magasabb trófikus szintek élőlényei számára (ROMANÍ 2009), és fokozzák az üledék stabilitását a víz eróziós hatásaival szemben (DROPPA 2009). A biofilmeket gyakran alkalmazzák monitorozási vizsgálatokban, mivel rövid életciklusuknak köszönhetően gyorsan reagálnak a környezetben bekövetkező változások hatásaira. Az aljzathoz rögzült életmódnak köszönhetően kiváló indikátor szervezetei a lokális szennyezéseknek, továbbá mikrobiális közösségei számtalan eltérő érzékenységgű fajból tevődnek össze és mintavételezésük könnyen elvégezhető (MCCORMICK és CAIRNS 1994, MAGES *et al.* 2004, MORIN *et al.* 2016). Tápanyaghiány esetén a biofilmek bakteriális közösségei különböző szennyezőanyagokat (pl. klórozott aromás szénhidrogének) használhatnak szénforrásként (WOLFAARDT *et al.* 1998). A biofilmeket számos tanulmányban alkalmazták különböző növényvédőszer-hatóanyagok (pl. *diuron*, *isopruton*, *methomyl*, *carbofuran*) (SCHMITT-JANSEN és ALTENBURGER 2005, TIEN *et al.* 2013, MARGOUM *et al.* 2015), gyógyszerhatóanyagok (PROIA *et al.* 2013, CORCOLL *et al.* 2015), antibakteriális anyagok (pl. *triclosan*) (LAWRENCE *et al.* 2009), valamint nehézfémek (pl. kadmium) (MORIN *et al.* 2008) hatásainak vizsgálata során.

Az édesvízi felszíni vizekben kialakuló biofilmek algaközösségének legdominánsabb csoportját a kovaalgák vagy kovamoszatok, más néven: a diatómák (*Bacillariophyceae*) alkotják (BLINN *et al.* 1980). A különböző kovaalgákat, több mint 10 éve rutinszerűen alkalmazzák a felszíni vizek szerves- és tápanyagszennyezésének felmérésére, mivel kiváló biológiai indikátorai a felszíni vizek ökológiai állapotváltozásának. Az EU-ban a 2000-ben hatályba lépett Víz Keretirányelv értelmében, a felszíni vizek ökológiai állapotminősítését öt élőlénycsoport, többek között a kovaalgák taxonómiai és funkcionális összetétele alapján kell elvégezni (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2000). A kovaalgák vizsgálatán alapuló vízminősítés elsősorban a diatómaindexek, mint például az integrált szennyezettségi index (*index of pollution sensitivity, IPS*) alkalmazásával valósul meg (ÁCS *et al.* 2006, LISKA *et al.* 2015). A diatómaindexek alkalmazása a fajok szintjén alapszik, azonban a faji meghatározás pontatlanságai miatt egyre elterjedtebbé váltak a további mutatók, többek között a biológiai jellegek (*trait*-ek) (pl. életforma, ökológiai *guild*-ek, sejtméret) vizsgálatán alapuló módszerek (PASSY 2007a, BERTHON *et al.* 2011, RIMET és BOUCHEZ 2011). A biológiai jelleg-alapú (*trait*-alapú) vizsgálatok azonban elsősorban kis vízfolyású folyókra korlátozódtak (PASSY 2007a, RIMET és BOUCHEZ 2011, STENGER-KOVÁCS *et al.* 2012, LAW *et al.* 2014). A nagy vízhozamú folyók esetében az *IPS*-index alkalmazása bizonyult megfelelőbbnek az ökológiai *guild*-ek használatával szemben, azonban a biológiai jelleg-alapú módszerek alkalmazása kiválóan kiegészítik az ökológiai állapotértékelés folyamatát (TRÁBERT *et al.* 2017). A biofilmekben elvégzett vizsgálatok előnye, hogy a különböző szennyező anyagok káros hatásai közösségi szinten is vizsgálhatók, továbbá az egy fajon végzett vizsgálatokkal szemben az összetett életközösségi szintű vizsgálatok jobban reprezentálják a környezetben lezajló természetes folyamatokat, mivel természetes körülmények között nemcsak egy faj egyedei, hanem különböző fajok népességei kerülnek kapcsolatba a környezetükbe kerülő szennyezőanyagokkal. A biofilmvizsgálatok – sokféleségük miatt – nehezen standardizálhatók, így kevésbé reprodukálhatók, eredményeik alapján viszont pontosabb következtetéseket vonhatunk le a vízi ökoszisztémákra vonatkozóan, valamint értékelhetők a különböző populációk egymásra gyakorolt hatásai is az expozíciót követően.

2.7. A környezetanalitikai vizsgálatok jelentősége és módszerei a különböző szermaradékok meghatározása során

A különböző környezeti elemekben (pl. talaj, talajvíz, felszíni vizek) megjelenő kémiai vegyületek, többek között a gyógyszerhatóanyagok és a növényvédőszer-készítmények hatóanyagainak, valamint azok bomlástermékeinek környezeti mintákból történő meghatározása

a környezetanalitika feladata. A különböző szennyezőanyagok környezeti koncentrációjának mértékét jelentősen befolyásolják többek között a kémiai vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. perzisztencia, vízoldékonyság) és a környezeti mátrix tulajdonságai (pl. pH, mikrobiális közösség aktivitása és összetétele) (SUKUL és SPITELLER 2006, MORRISSEY *et al.* 2015).

A környezetanalitikai vizsgálatoknak kiemelt szerepe van a környezeti monitorozási programok végrehajtásában, amelyek során a rendszeres mintavételek alapján történik a szennyezőanyagok térben és időben eloszlásának és változásainak vizsgálata különböző analitikai módszerek segítségével a begyűjtött környezeti mintákban. A környezetanalitikai vizsgálatok eredményei támogatják a környezeti kockázatbecslés folyamatát és a hatósági ellenőrzési tevékenységeket is, mivel a környezeti elemekre jogszabályban vagy hatósági határozatban megállapított határértékek (szennyezettségi határérték, kármentesítési célállapot határérték) megengedhető szintjének ellenőrzése szintén analitikai módszerekkel valósul meg (KVVM-EÜM-FVM 2009, VM 2010). A környezetanalitikai vizsgálatok fontossága az alap kutatásban, továbbá más tudományterületek, mint az ökotoxikológia kiegészítő diszciplínájaként sem elhanyagolható.

A különböző vegyületek környezeti mintákban történő pontos azonosítására és mennyiségi meghatározására számos analitikai módszer áll rendelkezésre. Az analitikai módszer megválasztása nagymértékben függ a minta fizikai-kémiai tulajdonságaitól (pl. halmazállapot, mennyiség) és a célvegyület paramétereitől (pl. polaritás, savas-bázikus jelleg), valamint az elérni kívánt kimutatási határtól (*limit of detection, LOD*). A környezetanalitika leggyakrabban alkalmazott módszerei közé tartoznak a különböző kromatográfiás (pl. gáz- és folyadékkromatográfia), spektroszkópiás (pl. tömeg-, atombaszorpciós spektroszkópia) és immunanalitikai [pl. enzimjelzéses *immunoassay* (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*)] eljárások. A minták analitikai vizsgálatának első lépése a minta-előkészítés, amely során a környezeti mintát a mérési módszernek megfelelő állapotba kell hozni a minta jellegének megfelelően megválasztott lépésekkel (pl. homogenizálás, hígítás, szűrés) (MAJZIK-SOLYMOS *et al.* 2001, BARAHONA *et al.* 2008). A kromatográfiás módszerek fontos lépése lehet az extrakció, amely során a célvegyület kivonását végezzük el különböző eljárások (pl. folyadék-, szilárd fázisú extrakció) alkalmazásával. Bizonyos esetekben származékképzésre, vagyis a célvegyületek kémiai módosítására is szükség lehet, amellyel javítható lehet a detektálhatóság (NEDELKOSKA és LOW 2004, MOLDOVEANU és DAVID 2017).

Saját környezetanalitikai vizsgálataink során a különböző vízmintákban a vizsgált GLY és neonicotinoid-típusú (ACE, CLO, IMI, TCL, TMX) hatóanyagok és LAS formázószer mennyiségét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel (*high performance liquid chromatography*) határoztuk meg fluoreszcens UV detektálás mellett (HPLC-UV). A GLY

esetében azonban, ahol a hatóanyag-koncentráció már a HPLC-UV detektálás kimutatási határa alá esett, az analízist folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás módszerrel (BYER *et al.* 2008, HANKE *et al.* 2008) is elvégeztük. A folyadékkromatográfiás módszerek nagyfokú szelektivitásuk és sokrétű alkalmazhatóságuk miatt egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek az utóbbi évtizedekben (MOLDOVEANU és DAVID 2017). A GLY hatóanyag analitikai meghatározása történhet még gázkromatográfiás (STRUGER *et al.* 2008) és ELISA (RUBIO *et al.* 2003) módszerekkel, valamint kapilláris elektroforézissel (KAWAI *et al.* 2011). A neonikotinoid-típusú hatóanyagok mennyiségi meghatározása más tanulmányokban is többnyire folyadékkromatográfiás módszerrel valósult meg (XIE *et al.* 2011, YÁNEZ *et al.* 2013). A hatóanyagok formázáskor felhasznált felületaktív anyagok környezeti mintákban történő analitikai meghatározása azok fizikai-kémiai jellemzőinek széles skálája miatt igen összetett feladat. A felületaktív anyagok környezeti koncentrációinak meghatározása a hatóanyagokhoz hasonlóan elsősorban gáz- és folyadékkromatográfiás módszerek alkalmazásával történik (DE VOOGT és KNEPPER 2003, BENEITO-CAMBRA *et al.* 2011, FERNÁNDEZ-RAMOS *et al.* 2012). A LAS analitikai meghatározása jellemzően szintén folyadékkromatográfiás módszerrel végezhető el különböző detektálási módszerek mellett (WANGKARN *et al.* 2005, SABLAYROLLES *et al.* 2009).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált hatóanyagok, készítmények és adalékanyagok jellemzése

A vizsgált állatgyógyászati hatóanyagok [*sulfadiazine* (SDZ), *sulfaguanidine* (SGD), *sulfamethazine* (SMZ), *sulfamethoxazole* (SMX), *trimethoprim* (TRI)] és készítmények (SUMETROLIM, COTRIM E-ratiopharm) főbb fizikai-kémiai tulajdonságait és összetételét a 3. melléklet I. táblázata tartalmazza (MACBEAN 2012, MERCKLE GMBH 2014, PHARMINDEX 2021). A hatóanyagok, mint analitikai standardok a Sigma Aldrich Kft.-től kerültek beszerzésre, amelyek tisztasága $\geq 97,5\%$. A SUMETROLIM (gyártó: EGIS Gyógyszergyár Zrt., Budapest) és COTRIM E-ratiopharm (gyártó: Merckle GmbH, Ulm, Németország) vényköteles készítményeket állatorvosi receptek beszerzését követően váltottuk ki. A vizsgált készítmények kiválasztása során elsődleges szempont volt, hogy az SMX és TRI hatóanyagok között ismert szinergens együttes hatások (ZINNER és MAYER 2015) különböző adalékanyagok jelenléte mellett és lehetőleg különböző kiszerelési formákban (pl. tabletta, szuszpenzió) is vizsgálhatóvá váljon. A készítmények humán orvoslásban történő alkalmazásuk mellett az állatgyógyászatban való felhasználásuk is ismert (B. KOVÁCS *et al.* 1978, BROOKS 2001, OLIN és BARTGES 2015).

A vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyagok [*acetamiprid* (ACE), *clothianidin* (CLO), *thiacloprid* (TCL), *thiametoxam* (TMX)], szintén a Sigma Aldrich Kft.-től beszerzett analitikai standardok, míg a készítményeket az adott forgalmi kategóriának megfelelően szükség esetén az előírt szakképesítéssel rendelkező növényvédelmi szakember felügyelete mellett helyi forgalmazóktól szereztük be. A vizsgált készítmények közül [ACTARA 240 SC (gyártó: Syngenta Inc., Basel, Svájc), APACHE 50 WG (gyártó: Sumitomo Chemical Takeda Agro Co. Ltd., Tokió, Japán), CALYPSO 480 SC (gyártó: Bayer CropScience AG, Leverkusen, Németország), MOSPILAN 20 SG (gyártó: Nisso Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Németország)] jelenleg már csak a MOSPILAN 20 SG rendelkezik érvényes hazai engedéllyel (NÉBIH 2021c). A vizsgált készítmények jellemzőit és a biztonsági adatlapjaikban feltüntetett összetételét a 3. melléklet II. táblázata mutatja be (ARYSTA LIFESCIENCE 2013, SUMI AGRO HUNGARY 2014, BAYER CROPSOURCE 2016, SYNGENTA 2016). A MOSPILAN 20 SG készítményben megtalálható lineáris alkil-benzol-szulfonátok (LAS) ökotoxikológiai vizsgálatát a Sigma Aldrich Kft. által forgalmazott detergenskeverék felhasználásával határoztuk meg, amely olyan homológok keveréke, ahol az alkillánc szénatomszáma C_{10-13} között változik.

A vizsgált *glyphosate* (GLY)-tartalmú növényvédőszer-készítmények (ROUNDUP CLASSIC, MEDALLON PREMIUM) és összetevőik jellemzőit a 3. melléklet III. táblázata foglalja

össze (MONSANTO EUROPE S.A. 2015, SYNGENTA 2018). A vizsgálatok során felhasznált GLY hatóanyagot [GLY-izopropilammónium (IPA)-só] (GLY-IPA) és alkil-poliglükózid (APG) detergenst (PLANTAPON LGC, gyártó: The Soap Kitchen, Devon, Egyesült Királyság) a helyi forgalmazóktól szereztük be, míg a POEA (polietoxilált faggyúaminok keveréke (új rövidítés szerint POE 15 faggyúamin vagy POEA 15 faggyú) formázóanyagot (EMULSON AG GPE 3SS) a gyártó (Lamberti S.p.A., Albizzate, Olaszország) bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgált formázóanyag-készítmények összetételét szintén a 3. melléklet III. táblázata mutatja be (LEMING 2009, THE SOAP KITCHEN 2020). A GLY formázott készítményeit [ROUNDUP CLASSIC (gyártó: Monsanto Europe S.A., Antwerp, Belgium), MEDALLON PREMIUM (gyártó: Syngenta Inc., Basel, Svájc)] a forgalmi kategóriáknak megfelelően helyi forgalmazóktól szereztük be, amelyek közül a MEDALLON PREMIUM jelenleg is rendelkezik érvényes hazai engedéllyel (NÉBIH 2021c). A vizsgált készítmények a GLY különböző sóját tartalmazzák, de a feltüntetett hatóanyag-koncentrációk mindkét készítmény esetében 360 g/l GLY szabad sav-koncentrációnak felelnek meg. A GLY hatóanyag vizsgálata során az ökotoxikológiai tesztekben csak a GLY-IPA-só hatásait vizsgáltuk. A vizsgált koncentrációtartományokban a vízdoldhatóság nem korlátozott egyik GLY hatóanyagforma esetében sem, továbbá vízben a hatóanyag só formái gyorsan olyan ionokká disszociálódnak, amelyek az ökotoxikológiai vizsgálatok esetében alkalmazott tápoldatokban és pufferoldatokban egyébként is megtalálhatók.

Az enzimaktivitás-vizsgálatok és a fehérjemérésekben használt festékanyag (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), szubsztrát (1-klór-2,4-dinitro-benzol, *CDNB*); L-glutation (γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin, redukált forma), Bradford-reagens és a referenciaanyagként alkalmazott marhaszérum-albumin [*bovine serum albumin (BSA)*], továbbá a foszfátpuffer készítéséhez felhasznált nátrium-hidrogénkarbonát a Sigma Aldrich Kft.-től kerültek beszerzésre.

Az analitikai vizsgálatok során a minta-előkészítéshez, származékképzéshez és a műszeres mérésekhez felhasznált 9-fluorenil-metiloxi-karbonil-klorid [*9-fluorenylmethyl chloroformate*, (FMOC-Cl)], szerves oldószerek (acetonitril, metanol, diklór-metán), továbbá a foszfát- és borátpufferek, hangyasav, ammónium-acetát és nátrium-acetát szintén a Sigma Aldrich Kft.-től szereztük be. A szilárd fázisú extrakciót Strata-X Polymeric SPE cartridge (Phenomenex, Torrance, CA, Egyesült Államok) töltetek felhasználásával végeztük el.

3.2. A nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) végzett ökotoxikológiai vizsgálatok

Vizsgálataink során a kiválasztott szulfonamid-típusú (*SDZ*, *SGD*, *SMZ*, *SMX*) és *TRI* állatgyógyászati, valamint neonikotinoid-típusú (*ACE*, *CLO*, *TCL*, *TMX*) és GLY növényvédőszer-hatóanyagok egyedi és a formázott készítményeikben megtalálható

adalékanyagaikkal együttes toxicitását vizsgáltuk nagy vízibolha (*Daphnia magna*) tesztszervezeten. A *D. magna* egyedeire gyakorolt akut immobilizációs (mozgásképtelenség kialakulása, mobilitásgátlás) hatásokat az összes vizsgált hatóanyag és kombináció esetében elvégeztük, míg az állatgyógyászati SMX és TRI, továbbá a neonikotoid-típusú ACE hatóanyagok és formázott készítményeik esetében a vizsgálatokat kibővítettük a glutation-S-transzferáz (GST) enzimaktivitásának meghatározásával is. A standard ökotoxikológiai vizsgálatokat, minden esetben tartománymeghatározó (*range-finding*) kísérletek előzték meg az összes vizsgált anyag esetében, az elérhető szakirodalmi és toxicitáscsúszatok figyelembevételével. A koncentrációk kiválasztása úgy történt, hogy amennyiben az anyag oldhatósága engedte, a legmagasabb koncentrációban 90–100%-os, míg a legalacsonyabb koncentrációban 0–10%-os hatást/gátlást tapasztaljunk. A készítmények és keverékek összehasonlító vizsgálata során a meghatározott EC₅₀-értékeket az összehasonlítás szempontjainak megfelelően a hatóanyag- vagy formázóanyag-tartalomra korrigáltuk. Az együttes méreghatás formájának meghatározása, ahol az lehetséges a 48h EC₅₀-értékek statisztikai összehasonlítása, valamint a keverékben és egyedileg meghatározott értékek hányadosainak összege alapján történt (SORENSEN et al. 2007, BAKONYI 2020b).

3.2.1. A nagy vízibolha (*Daphnia magna*) tenyésztésének fenntartása

A *D. magna* tesztszervezeten elvégzett vizsgálatainkat a MATE KÖTI AKK saját laboratóriumi tenyésztésén végeztük el. A *D. magna* (Straus) törzstenyésztet a *LAB Research Hungary* (jogutódja: Charles River Laboratories Hungary Kft.) vállalatától származik. A tenyésztet fenntartása az *OECD* 202 protokollnak megfelelően 20±2°C-on és napi 16-órás megvilágítás mellett történik intézetünkben (*OECD* 2004). A vízibolhaegyedek tartása csoportosan, nagyméretű egerpoharakban, az *OECD* 202 ajánlásainak megfelelően elkészített sóoldatban (*ISO Test water*), ún. *Daphnia*-oldatban történik (pH = 6–9), amely különböző sók (123 mg/l MgSO₄, 5,75 mg/l KCl, 65 mg/l NaHCO₃ és 294 mg/l CaCl₂) oldataiból és desztillált vízből tevődik össze (*ISO* 2012a). A tenyésztetek etetése heti 3 alkalommal, az intézet egysejtű zöldalgatenyészteteiből (elsősorban *Pseudokirchneriella subcapitata*) származó algaszuszpenzióval történik, amelyet az etetést megelőzően *Daphnia*-oldattal mosunk át (centrifugálás: 3000 fordulat/perc, 30 percig, majd a leülepedett algasejtek viaszszuszpendálása *Daphnia*-oldatban, a lépéseket háromszor megismétljük). A tenyészedeények alján összegyűlt szennyeződések és a tenyészközeg tetején kialakuló filmréteget heti 3 alkalommal eltávolítjuk. A tenyészedeényekben hetente részleges, havonta pedig teljes vízcserét hajtunk végre, melyhez frissen készített, min. 30 percig levegőztetett *Daphnia*-oldatot használunk. A *Daphnia*-tenyésztetek érzékenységét fél évente

ellenőrizzük. Az érzékenységi vizsgálat során a referenciaanyaggal (kálium-dikromát, $K_2Cr_2O_7$) végzett akut immobilizációs teszt esetében meghatározott 24h EC_{50} -értéknek az elfogadható tartományon belül kell maradnia (0,6–2,1 mg/l) (OECD 2004, ISO 2012a), annak érdekében, hogy a különböző *Daphnia*-tenyészeteken végzett tesztek eredményei elfogadhatók és összehasonlíthatók legyenek. A vizsgálatok során a tenyészet minden esetben megfelelőnek bizonyult a vizsgálati periódusok során (24h EC_{50} = 1,0±0,3 mg/l).

3.2.2. Akut immobilizációs vizsgálat

A nagy vízibolhán végzett akut immobilizációs vizsgálatokat az OECD 202 protokoll alapján végeztük el (OECD 2004). A teszt során használt egyedek életkora nem haladta meg a 24 órát. A vizsgálatokat üvegből készült 15 ml-es *faeces*-poharakban végeztük el, a megfelelő környezeti körülmények mellett ($T = 20 \pm 2^\circ C$, 16:8-órás fény-sötét-ciklusok, pH = 6–9). A vizsgált anyagok törzsoldataiból felező hígítással öttagú hígítási sort készítettünk *Daphnia*-oldat felhasználásával, így a vizsgált anyag hatásait minden tesztben 5 különböző koncentrációban kontrollcsoportok alkalmazása mellett határoztuk meg (2. ábra). A vizsgált koncentrációk hatásait és a kontrollkörülményeket is 4 ismételtsben vizsgáltuk. A tesztedényekbe minden ismételts esetében 10 ml tesztoldat, illetve a kontrollcsoportok esetében 10 ml tiszta *Daphnia*-oldat került bemérésre, továbbá 5 db véletlenszerűen kiválasztott *Daphnia* juvenil került elhelyezésre. A vizsgálat végpontja az immobilizáció volt, tehát 24 és 48 óra elteltével ellenőriztük a tesztkörülményeket (pH, oldott oxigéntartalom, hőmérséklet) és meghatároztuk a mozgásképes egyedek számát minden egyes pohárban. Egy egyed akkor tekintünk immobilis, vagyis mozgásképtelen egyednek, ha az oldat óvatos megkeverését követően sem képes helyváltoztatásra 15 másodpercen belül. A csápok (antennák) mozgása nem minősül mozgásnak. A kontrollcsoportokban az egyedek mozgásképtelensége egyik esetben sem haladta meg a 10%-ot a 48-órás tesztperiódus során, továbbá az oldott oxigéntartalom nem csökkent 3 mg/l alá, így a vizsgálatok érvényesnek tekinthetők. A vizsgálatokat minden állatgyógyászati és növényvédőszer-készítmény, továbbá a ható- és formázóanyag vizsgálata során, továbbá a kombinációk esetében is 3 ismételtsben végeztük el.

A vizsgált állatgyógyászati hatóanyagokat és készítményeket a 3. melléklet I. táblázata mutatja be, míg a növényvédőszer-hatóanyagok és készítményeik jellemzőit a 3. melléklet II. és III. táblázatai foglalják össze. A vizsgált ható- és formázóanyagok egyedi toxicitása mellett, azok együttes hatásait készítményeik formájában vizsgáltuk, és ahol ismert a készítményben a formázóanyag minősége és mennyisége (MOSPILAN 20 SG, ROUNDUP CLASSIC), ott tiszta

keverékek formájában is vizsgáltuk a ható- és formázóanyagok kombinált hatásait, a készítményekben feltüntetett koncentrációkkal ekvivalens arányban.

Az immobilizációs vizsgálatokban alkalmazott koncentrációtartományok a következők voltak: (1) Állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények: *SDZ*: 7–112 mg/l; *SGD*: 1–16 mg/l; *SMZ*: 9–144 mg/l; *SMX*: 20–320 mg/l; *TRI*: 20–320 mg/l; *SUMETROLIM*: 20–320 mg/l; *COTRIM E-ratiopharm*: 315–5040 mg/l; *SMX* és *TRI* tiszta keveréke: *SMX*: 10–160 mg/l, *TRI*: 2–32 mg/l (2) Neonikotinoid-típusú hatóanyagok, készítmények és a *LAS* formázóanyag: *ACE*: 12,5–200 mg/l; *CLO*: 21–340 mg/l; *TCL*: 4,5–72 mg/l; *TMX*: 1,5–280 mg/l; *ACTARA 240 SC*: 268–4288 mg/l; *APACHE 50 WG*: 10–160 mg/l; *CALYPSO 480 SC*: 12,5–200 mg/l; *MOSPILAN 20 SG*: 20–320 mg/l; *LAS*: 3–48 mg/l; *ACE* és *LAS* tiszta keveréke: *ACE*: 0,5–8 mg/l, *LAS*: 0,05–0,8 mg/l (3) *GLY* és formázott készítményei, valamint formázószerei: *GLY-IPA*: 100–1600 mg/l; *ROUNDUP CLASSIC*: 6–96 mg/l; *MEDALLON PREMIUM*: 130–2080 mg/l; *POEA*: 1–16 mg/l; *APG*: 7–112 mg/l; *GLY* és *POEA* tiszta keveréke: *GLY-IPA*: 4,3–68,8 mg/l, *POEA*: 1–16 mg/l.



2. ábra Akut immobilizációs vizsgálat *Daphnia magna* tesztszervezeten (saját fotó)

A vizsgált *GLY*-tartalmú *ROUNDUP CLASSIC* és *MEDALLON PREMIUM* készítmények és összetevőinek egyedi és kombinált hatásainak vizsgálatát a MicroBioTests által forgalmazott *Daphtoxkit F* tesztsomag (gyártó: MicroBioTests Inc., Gent, Belgium) segítségével, a tesztsomag által biztosított *D. magna* egyedeken is elvégeztük. A tesztsomagban biztosított tartós petéket a vizsgálat kezdetét megelőzően 50 ml *Daphnia*-oldatban, 6000 lux fényerősség és folyamatos megvilágítás mellett, 22°C fokon, 72 órán keresztül inkubáltuk. A saját laboratóriumi tenyészetek esetében a fiatal egyedeknek lehetőségük van táplálékfelvételre a tenyésztőközegeből, a tesztsomagban a tartós peték keltetése azonban tiszta *Daphnia*-oldatban valósul meg, így

szükség van a tesztek beállítását megelőző előtetetésre, amely során a 72-órás inkubációt követően a juvenileket a gyártó által biztosított *Spirulina*-porral etettük meg. Az etetést követően 2 óra elteltével került sor a teszt beállítására.

A vizsgált anyagok egyedi és kombinált toxicitását a ToxRat Pro 3.0 statisztikai szoftver (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Németország) segítségével meghatározott 48h EC₅₀-értékek alapján jellemeztük. Az alkalmazott program a toxikológiai mérőszámok meghatározása mellett automatikusan ellenőrzi a standard vizsgálatok érvényességi kritériumainak teljesülését is. A statisztikai elemzés során általános lineáris modellt alkalmaztunk az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) használatával. Az adatok normalitását és a varianciák homogenitását minden esetben diagnosztikai ábrákkal (QQ-plot), Shapiro–Wilk- és Levene-tesztek alkalmazásával ellenőriztük. Az adatok statisztikai kiértékelése azokban az esetekben, ahol a választott modell alkalmazásának feltételei nem teljesültek, Kruskal-Wallis próbával valósult meg 5%-os szignifikancia szinten.

3.2.3. A glutation-S-transzferáz aktivitásának meghatározása nagy vízibolha (*Daphnia magna*) juvenilekben

A vizsgált állatgyógyászati és neonikotinoid-készítmények összetevőinek egyedi és kombinált hatásait a GST-enzimaktivitásra szintén a nagy vízibolha juvenil egyedek vizsgáltuk. Az állatgyógyászati hatóanyagok (*SMX* és *TRI*) egyedi toxicitása mellett, a formázott készítményben (SUMETROLIM) megtalálható adalékanyagokkal együttes toxicitásukat is értékeltük. Az enzimaktivitás-vizsgálatokban az akut tesztek során meghatározott 48h EC₂₀-értékeknek megfelelő koncentrációk hatásait vizsgáltuk, mivel a dózis–hatás-görbék esetében, ennél az értéknél még nem volt tapasztalható az egyedek jelentős mértékű elhullása, amely befolyásolhatná a vizsgált minta nagyságát. A vizsgálatok során alkalmazott koncentrációk: *SMX*: 30 mg/l; *TRI*: 30 mg/l és SUMETROLIM: 35 mg/l (*SMX*: 23,5 mg/l, *TRI*: 4,7 mg/l).

A vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyag (*ACE*) és a kiszerelt formulációban (MOSPILAN 20 SG) felhasznált formázóanyag (*LAS*) egyedi és kombinált toxicitását szintén meghatároztuk a formázott készítmény, valamint az *ACE* és a *LAS* tiszta keverékének formájában is. A tiszta keverékben az alkalmazott koncentrációk megfeleltek a MOSPILAN 20 SG ható- és formázóanyag-összetételének (3. melléklet II. táblázat). Az *ACE* és a *LAS* egyedi és kombinált hatásainak vizsgálatában alkalmazott koncentrációk: *ACE*: 65 mg/l, *LAS*: 3,8 mg/l, MOSPILAN 20 SG: 77 mg/l (*ACE*: 15,6 mg/l, *LAS*: 1,9 mg/l), *ACE* és *LAS* tiszta keveréke: *ACE*: 7,4 mg/l, *LAS*: 0,9 mg/l. Az enzimaktivitás-vizsgálatokat az MTA Ökológiai Kutatóközpont

(ÖK) Balatoni Limnológiai Intézetében) [jogutódja: Eötvös Loránd Kutatási Hálózat (ELKH) Balatoni Limnológiai Kutatóintézet (BLK)] Dr. Győri János vezetésével végeztük el.

Az enzimaktivitás-vizsgálatok során szintén 24 óránál fiatalabb egyedeket használtunk fel. A vizsgált anyagok expozícióját 100 ml-es főzőpoharakban valósítottuk meg, 48 órán keresztül, meghatározott környezeti körülmények mellett ($T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, 16:8-órás fény-sötét-ciklusok, $\text{pH} = 6-9$). A vizsgált anyagok törzsoldatait frissen összeállított és átlegegőztetett *Daphnia*-oldatban készítettük el. A kezelések hatásait 3 ismétlésben vizsgáltuk kontrollcsoportok alkalmazása mellett. A főzőpoharakba minden ismétlés esetében 70 ml tesztoldat, illetve a kontrollcsoportok esetében 70 ml tiszta *Daphnia*-oldat, továbbá 35 db véletlenszerűen kiválasztott *Daphnia* juvenil került elhelyezésre. A 48-órás expozíció során az állatokat nem etettük. A vizsgálatokat minden vizsgált anyag esetében háromszor megismételtük.

Az expozíciót követően a túlélő (ismétlésenként min. 30 db) egyedeket Eppendorf-csövekben gyűjtöttük össze, majd pipettával eltávolítottuk az alkalmazott *Daphnia*- vagy tesztoldatot. Az összegyűjtött egyedeket 500 μl hűtött 0,1 M foszfátpufferben ($\text{pH} = 7,2$) -80°C -on tároltuk, majd az enzimvizsgálatok során, a jégén történő kiolvasztás után a mintákat fémgolyós ($d = 1 \text{ mm}$) szövethomogenizátorral (TyssueLyser, Qiagen, Hilden, Németország) homogenizáltuk (5 perc, 47 Hz, 40 f/s fordulatszám). Az elkészített homogenizátumokat 11 500 g mellett 4°C -on 25 percig centrifugáltuk (Heraeus Biofuge fresco mikrocentrifuga, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok), majd előhűtött 0,5 ml-es Eppendorf-csövekbe (Protein LoBind Tubes, minimális fehérjemegkötés, Eppendorf, Bécs, Ausztria) 400 μl felülúszót átpipettáztunk és a mintákat felhasználásig jégén tároltuk.

A minták specifikus enzimaktivitása alatt az egységnyi fehérjemennyiségre (mg) vonatkoztatott, adott időegység alatt (perc) átalakított szubsztrátmennyiséget (μmol) értjük, így az enzimaktivitás-vizsgálatokat megelőzően meghatároztuk a minták összfehérje-tartalmát. A fehérjetartalom meghatározását a Bradford módszer (1976) alapján 96-lyukú mikrotálcákban végeztük el *Coomassie Brilliant Blue* G-250 festék felhasználásával, amely fehérjéhez kötődve kék színreakciót eredményez. A mintákból 20 μl -t pipettáztunk át a mikrotálcák meghatározott lyukaiba, amelyhez 180 μl Bradford-reagenst adtunk hozzá. A reagensadagolást követően a mintákat 6 percen keresztül sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd spektrofotometriás módszerrel (Victor 2 Multilabel mikrotálca-olvasó, PerkinElmer, Waltham, MA, Egyesült Államok) határoztuk meg a minták abszorbanciáját 580 nm hullámhosszon). A mérések során vakként 200 μl Bradford-reagenst alkalmaztunk. A fehérjemeghatározás során a referenciaanyagként alkalmazott BSA felhasználásával végeztük el a kalibrációt. A minták fehérje-koncentrációját három ismétlésben, a kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

A xenobiotikumok biotranszformációjában (detoxifikációs folyamatokban) fontos szerepet játszó GST aktivitástesztjeit szintén 96-lyukú mikrotálcákban végeztük el (HABIG *et al.* 1974). A kolorimetriás meghatározás alapja a GST által katalizált glutation és a szubsztrátként alkalmazott *CDNB* közötti reakció, ahol a reakció sebessége a jelenlévő aktív GST enzim mennyiségének függvénye. Az enzimaktivitás jellemzése a keletkező reakciótermék, bisz-(dinitro-fenil)-tioéter mennyisége alapján történik amelynek abszorbanciáját 340 nm-en határozzuk meg (FRASCO és GUILHERMINO 2002). A mérések során 20 µl mintát pipettáztunk az előhűtött mikrotálca adott celláiba, amelyhez 180 µl reakcióelegyet adtunk hozzá. A reakcióelegy elkészítése során két törzsoldatot készítettünk el: (i) 200 mM L-glutation (redukált forma) -törzsoldat bidesztillált vízben elkészítve, (ii) 100 mM *CDNB*-törzsoldat, amelyet elszívó fülke alatt, melegítés mellett, etanol felhasználásával állítottunk össze. A reakcióelegy összetétele: 9,8 ml APHA-puffer (pH = 6,6), 0,1 ml L-glutation-törzsoldat és 0,1 ml *CDNB*-törzsoldat. A reakcióelegyet a mérések előtt frissen állítottuk össze, majd két órán belül felhasználtuk a vizsgálatok során. A reakcióelegy hozzáadását követően a minták abszorbanciaváltozását 340 nm-es hullámhosszon, 3 percen keresztül, 15-másodperces olvasási gyakorisággal követtük nyomon spektrofotometriás módszerrel (Victor 2 Multilabel mikrotálca-olvasó, PerkinElmer, Waltham, MA, Egyesült Államok). A mérések során vakként 200 µl reakcióelegyet alkalmaztunk. A mintákban a GST-aktivitást három ismétlésben határoztuk meg. Az extinkció–reakcióidő-görbe lineáris szakaszának meredekségéből határoztuk meg az enzimaktivitás változását. A következő képlet alkalmazásával minden egyes cellára megadható a GST-aktivitás.

$$\text{GST } (\mu\text{mol/min/mg}) = \frac{\Delta A / \text{min} * 0,2 \text{ ml}}{(7,68 \text{ mM} * v)} * \text{minta hígítási foka}$$

ahol:

v mintatérfogat

$\Delta A/\text{min}$ percenkénti abszorbanciaváltozás

0,2 ml reakció térfogat 96-lyukú mikrotálca esetében

7,68 mM a *CDNB* extinkciós koefficiense 340 nm hullámhosszon, 96-lyukú mikrotálca esetében

A különböző kezelések enzimaktivására gyakorolt hatásait az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) használatával értékeltük ki, majd hasonlítottuk össze. A statisztikai elemzés során egytényezős varianciaanalízis (*one-way ANOVA*) alkalmazásával értékeltük a kezelések hatását, majd a csoportok közötti összehasonlítások során *post-hoc* tesztként Tukey-tesztet végeztünk el. Az adatok normalitását és

a varianciák homogenitását minden esetben diagnosztikai ábrákkal (QQ-plot), Shapiro–Wilk- és Levene-tesztek alkalmazásával ellenőriztük a varianciaanalízist megelőzően.

3.3. Lebegő életmódú, egysejtű algafajokon végzett ökotoxikológiai vizsgálatok

Ökotoxikológiai vizsgálataink során meghatároztuk a GLY-tartalmú ROUNDUP CLASSIC és MEDALLON PREMIUM készítmények és összetevőik egyedi és kombinált toxikus hatásait különböző lebegő egysejtű, zöld- (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obtusiusculus*) és kékalga- (*Anabaena flos-aquae*) fajok szaporodására és fotoszintetikus aktivitására, amely a potenciális fitotoxikus hatások felderítése mellett lehetővé tette a vizsgált fajok érzékenységeinek összehasonlítását, továbbá a vizsgált végpontok alkalmazhatóságának értékelését egyaránt.

3.3.1. Az algatenyészetek fenntartása

A különböző algafajokon elvégzett vizsgálatainkat szintén a MATE KÖTI AKK saját laboratóriumi törzsein végeztük el. Az eredeti törzstenyészetek különböző külföldi törzsgyűjteményekből származnak. A *P. subcapitata* törzstenyészet (NIVA-CHL1) a Norvég Vízkutató Intézet (*Norwegian Institute for Water Research*, NIVA) algagyűjteményéből, míg a többi zöldalga *D. subspicatus* (CCAP 276/20), *S. obtusiusculus* (CCAP 276/25) és fonalas cianobaktérium *A. flos-aquae* (CCAP 1403/13D) törzs a skót Alga- és Protozoa-Törzsgyűjteményből (*Culture Collection of Algae and Protozoa*, CCAP) származik.

Az algatenyészetek fenntartása az OECD 201 protokoll alapján $20 \pm 2^\circ\text{C}$ -on folyamatos megvilágítás mellett történik (OECD 2006). A tenyészetek fenntartása 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban történik, amelyeket felhasználás előtt autoklávban sterilizálunk (20 perc, 121°C , Boeco BTE-23D, Boeco Germany, Hamburg, Németország). A tenyészedenyekben a tenyészet térfogata kb. 100 ml, amelyeket vattadugóval és alufóliával zárunk le, óvva a tenyészeteket a külső szennyező forrásoktól. Az tenyészeteket a nemzetközi törzsgyűjtemények ajánlásainak megfelelő, meghatározott összetételű folyékony tápoldatokban tartjuk fenn. A zöldalgafajok tenyésztése Zehnder-8-tápoldatban ($\text{pH} = 6\text{--}7$) (SCCAP 2020), míg az *A. flos-aquae*-tenyészet fenntartása Allen-tápoldatban ($\text{pH} = 6\text{--}7$) történik (ALLEN 1968). A tápoldatokat desztillált vízben készítjük el a különböző sók és nyomelemek törzsoldataiból. Az algaszaporodás-gátlási tesztekben követelmény, hogy a felhasznált algatenyészet a kísérlet teljes időtartama (72 óra) alatt exponenciális szaporodási fázisban legyen, ezért a tenyészeteket heti rendszerességgel steril körülmények között, lamináris fülke alatt (Laminar AirFlow BL 1200-F, Radel & Hahn Zrt,

Debrecen) oltjuk át, elkerülve a más algafajokkal és gombákkal történő szennyeződést. Az átoltás során az inokulum (az algasejt-koncentrációtól függő térfogatú algaszuszpenzió) mennyiségét úgy választjuk meg, hogy a sejtek koncentrációja kb. 100-szor kisebb legyen a frissen beoltott tenyészetben. Az átoltott tenyészet kb. 11 nap alatt kerül exponenciális növekedési szakaszba. A sejtsűrűséget Bürker-kamrás sejtszámlálással és az optikai sűrűség (OD) meghatározásával ellenőrizzük. Az átoltást megelőzően a felhasznált üvegeszközöket, tápoldatot és a vattadugókat előzetesen autoklávban sterilizáljuk, továbbá mikroszkóp alatt ellenőrizzük az eredeti tenyészetek minőségét (más algafajok/protozoák jelenléte, aggregálódás, abnormális sejtformák). Az tenyészetek érzékenységét az ISO 8692:2012 szabványnak megfelelően félévente ellenőrizzük. Az érzékenységi vizsgálat során a referenciaanyaggal (kálium-dikromát, $K_2Cr_2O_7$) végzett algaszaporodás-gátlási tesztek esetében meghatározott 72h EC_{50} -értékeknek az elfogadható tartományon belül kell maradnia (pl. *D. subspicatus*: $0,8 \pm 0,1$ mg/l; *P. subcapitata*: $1,2 \pm 0,3$ mg/l (ISO 2012b), annak érdekében, hogy a különböző algatenyészeteken végzett tesztek eredményei elfogadhatók és összehasonlíthatók legyenek. A vizsgálatba vont algatenyészetek érzékenysége minden esetben megfelelőnek bizonyult a vizsgálati periódusok során ($72h EC_{50} = 1,0 \pm 0,1$ mg/l).

3.3.2. Algaszaporodás-gátlási tesztek

A ROUNDUP CLASSIC és MEDALLON PREMIUM készítmények összetevőinek egyedi és kombinált fitotoxikus hatásait algaszaporodás-gátlási tesztekben vizsgáltuk az OECD 201 protokoll alapján (OECD 2006). A vizsgálatokat három lebegő egysejtű zöldalgafajon (*P. subcapitata*, *D. subspicatus*, *S. obtusiusculus*) és a GLY hatóanyag esetében egy fonalas kékalgafajon (*A. flos-aquae*) is elvégeztük. A vizsgálatokat 300 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, a megfelelő környezeti körülmények mellett [$T = 22 \pm 2^\circ C$, folyamatos és egyenletes hideg fehér fényű megvilágítás (7760 ± 1100 lux), folyamatos rázatás] végeztük el. A tesztekben a tenyészetek fenntartása során alkalmazott tápoldatokat (Zehnder 8 vagy Allen) használtuk fel. A vizsgált anyagok törzsoldataiból felező hígítással öttagú hígítási sort készítettünk. A tesztedényekbe minden ismétlés esetében 50 ml tesztoldat, illetve a kontrollcsoportok esetében 50 ml tiszta tápoldat került bemérésre. A vizsgált koncentrációk hatásait és a kontrollkörülményeket is 3 ismétlésben vizsgáltuk, továbbá beállítottunk egy negyedik ismétlést is, amelyet a vizsgálatok során mérési vakként használtunk.

A tesztoldatok és a kontrollcsoportok esetében a tápoldat tesztedényekbe történő bemérését követően, a mérési vakok kivételével, minden lombikba annyi algainokulomot adagolunk, hogy a kezdeti kiindulási élőanyag-koncentráció (algasűrűség) minden lombikban

azonos legyen, továbbá biztosítható legyen az élőanyag exponenciális növekedése az expozíciós idő teljes időtartama (72 óra) alatt a tápanyagok elfogyásának veszélye nélkül. Az általunk alkalmazott kiindulási élőanyag-koncentráció kb. 10^5 db sejt/ml volt, ami meghaladja az *OECD* által ajánlott sejtkoncentráció-tartományt, azonban a vizsgált helyettesítő paramétereket meghatározó módszerek ezt a koncentrációtartományt képesek nagy megbízhatósággal és jól reprodukálható módon meghatározni, az exponenciális növekedésre irányuló feltételek teljesülése mellett. Az algasejtek hozzáadását követően a lombikokat egyrétegű, légáteresztő szűrőpapírral lefedve inkubáltuk 72 órán át, folyamatos rázatás (100 fordulat/perc) mellett, fűthető-hűthető beépített világítással rendelkező inkubátor használatával (Witeg WIS-10RL, Wertheim, Németország). A vizsgálat végpontja az algaszaporodás gátlása volt. A kísérlet során a kontrollcsoportban naponta meghatároztuk az algasejtsűrűséget a kívánt fajlagos szaporodási sebesség nyomon követésének érdekében, a tesztkörülmények ellenőrzése mellett. A kísérlet végén minden kontroll- és kezelt csoportban meghatároztuk az alga élőanyag-mennyiségét.

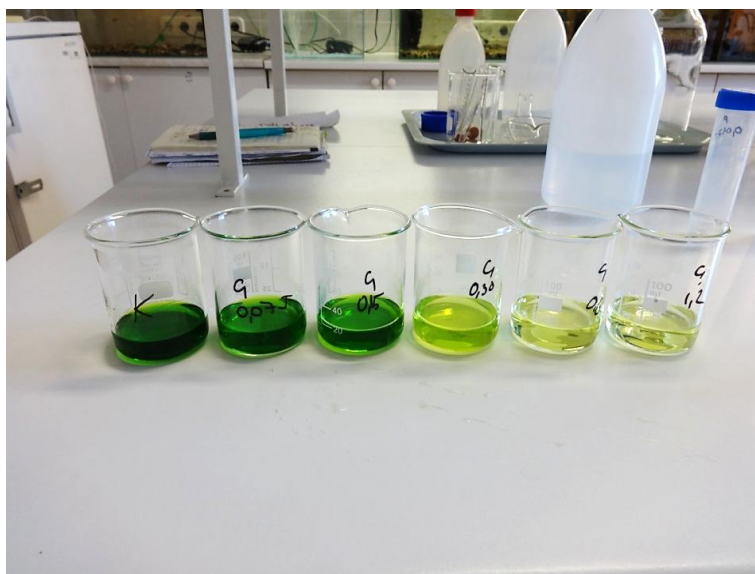
Az élőanyag mennyiségi meghatározására leggyakrabban alkalmazott paraméterek a sejtszám és az OD. A sejtszámlálást inverz mikroszkóp használatával (Olympus IX73, Tokió, Japán) 400-szoros nagyításon Bürker-számlálókamrával (Magyar Optikai Művek, Budapest) határoztuk meg. A sejtszámlálást minden minta esetében háromszor végeztük el. A töményebb sejtkoncentrációk esetében a minták hígítására volt szükség, ami viszont a meghatározások során növelheti a pontatlanságot. Az *A. flos-aquae* fonaltelekben fejlődik, amelyek mérete nagymértékben függ a tenyésztés körülményeitől, így a sejtszámlálást megelőzően a láncok feltörését ultrahangos kezeléssel végeztük el, ezzel csökkentve a sejtszámlálás szórását. Az OD meghatározását 750 nm hullámhosszon spektrofotométer (UV/VIS Camspec single beam M330, Camspec, Crawley, Egyesült Királyság) használatával végeztük, szintén minden minta esetében 3 ismételtsben, szükség szerinti hígítás mellett (ISO 2012b). A két vizsgálati módszer közötti korreláció minden esetben igen magasnak bizonyult ($R^2 > 0,998$). Az OD meghatározása mellett a *P. subcapitata* és *D. subspicatus* fajokon elvégzett vizsgálatokban a ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek algaszaporodásra gyakorolt hatásait a minták klorofill-a-tartalma alapján is értékeltük. Az *A. flos-aquae* fonalas szerkezete miatt a sejtszámlálás nehézkes, így a klorofill-a-tartalom meghatározásával megbízhatóbb eredményeket kapunk. A klorofill-a-meghatározás és a Bürker-kamrás sejtszámlálás között is magas korrelációt tapasztaltunk ($R^2 > 0,999$). A minták klorofill-a-tartalmának meghatározását spektrofotometriás módszerrel, alkoholos extrakció után végeztük el, szintén 3 ismételtsben (ISO 1992) (3. ábra).

A klorofill-a-meghatározás első lépése a minták (25 ml algaszuszpenzió, M) centrifugálása volt, Rotina 46R készülékkel (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Németország) 25 percen keresztül, 3700 fordulat/perc fordulatszámon. A leülepedett algasejteket 10 ml 96%

etanol (m) hozzáadásával roncsoltuk, majd a mintákat 15 percre vízfürdőbe helyeztük 75°C-on. A centrifugacsöveket folyóvízben szobahőmérsékletre hűtöttük vissza, majd 20 percig centrifugáltuk 4700 fordulat/perc fordulatszámon. A minták abszorbanciáját három különböző hullámhosszon: 750 (zavarosság mértéke), 666 (klorofill-a első mérési hullámhossza) és 653 nm (klorofill-a második mérési hullámhossza) határoztuk meg. A klorofill-a-tartalom [$\mu\text{g/l}$] meghatározásához a Felföldy-féle (1987) képletet alkalmaztuk.

$$C_a = [((17,12 \cdot (E_{666} - E_{750}) - 8,68 \cdot (E_{653} - E_{750})) \cdot m \cdot 10^3) / M]$$

Az elvégzett vizsgálatokban és a kontrollcsoportokban a szakaszonkénti (0–1., 1–2., 2–3. nap) fajlagos szaporodási sebesség variációs együtthatója 35% alatt maradt. A kísérlet teljes időtartama alatt az átlagos fajlagos szaporodási sebesség variációs együtthatója nem haladta meg a 7%-ot a párhuzamos kontrolltenyészetekben, továbbá az élőanyag mennyisége a kontrollban több mint 16-szorosára növekedett 72 óra elteltével, így a vizsgálatok érvényesnek tekinthetők. A vizsgálatokat a növényvédőszer-készítmények, valamint a ható- és formázóanyagok vizsgálata során is 3 ismételtsben végeztük el.



3. ábra Algaszaporodás-gátlási vizsgálatból származó minták klorofill-a-tartalom meghatározása *Desmodesmus subspicatus* tesztstruzezetben (saját fotó)

A GLY-tartalmú ROUNDUP CLASSIC és MEDALLON PREMIUM készítmények (3. melléklet III. táblázat) és összetevőinek egyedi és az adalékanyagokkal együttes kombinált toxicitását formázott készítmények formájában vizsgáltuk. Az algaszaporodás-gátlási tesztekben alkalmazott koncentrációtartományok a következők voltak a különböző fajok esetében: (1) *P.*

subcapitata: GLY-IPA: 22–352 mg/l; ROUNDUP CLASSIC: 3,5–56 mg/l; MEDALLON PREMIUM: 45–720 mg/l; POEA: 0,5–8 mg/l; APG: 6,5–104 mg/l (2) *D. subspicatus*: GLY-IPA: 22–352 mg/l; ROUNDUP CLASSIC: 7–112 mg/l; MEDALLON PREMIUM: 95–1520 mg/l; POEA: 0,8–13 mg/l; APG: 10–160 mg/l (3) *S. obtusiusculus*: GLY-IPA: 22–352 mg/l; ROUNDUP CLASSIC: 15–240 mg/l; MEDALLON PREMIUM: 125–2000 mg/l; POEA: 1,5–24 mg/l; APG: 30–480 mg/l (4) *A. flos-aquae*: GLY-IPA: 4,5–36 mg/l.

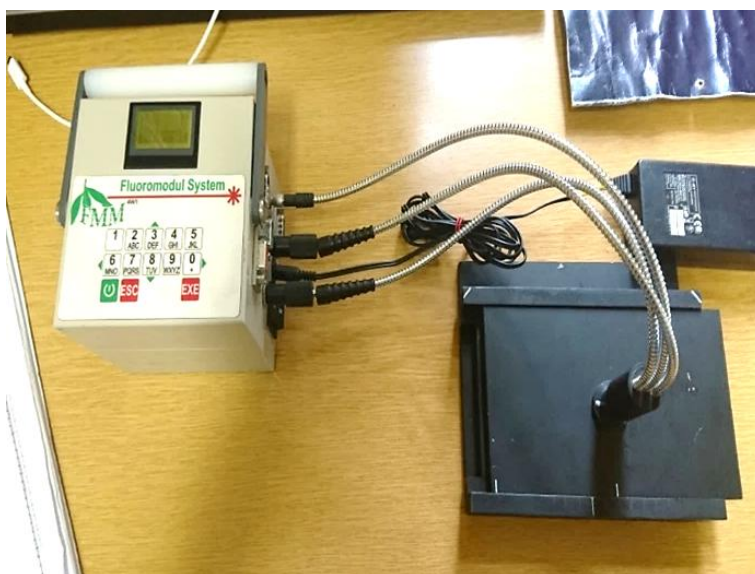
A vizsgált anyagok egyedi és kombinált toxicitását a 72h EC₅₀-értékek meghatározásával jellemeztük, amelyet az OD és a klorofill-a-tartalom mérésének eredményei alapján is meghatároztunk. Az egyedi és kombinált hatások összehasonlító vizsgálata során a készítmények estében meghatározott 72h EC₅₀-értékeket az összehasonlítás szempontjainak megfelelően a hatóanyag- vagy formázóanyag-tartalomra korrigáltuk. A 72h EC₅₀-értékeket mindkét mért paraméter esetében a ToxRat Pro 3.0 statisztikai szoftverrel határoztuk meg (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Németország). A statisztikai kiértékelést lineáris modellek alkalmazásával végeztük el az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) használatával. Az adatok kiértékelése azokban az esetekben, ahol a választott modell alkalmazásának feltételei nem teljesültek, Kruskal-Wallis próbával valósult meg, a különböző csoportok Student-Newman-Keuls (SNK) teszttel történő összehasonlítása mellett 5%-os szignifikancia szinten.

3.3.3. Fotoszintetikus aktivitás vizsgálata algaszuszpenziókban

A ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek az algák fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatásait *P. subcapitata* zöldalgafajon vizsgáltuk. A fotoszintetikus aktivitást az algaszaporodás-gátlási vizsgálatokból származó mintákban határoztuk meg a 72-órás expozíciót követően. A méréseket a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (BME) Atomfizika Tanszékének munkatársai által fejlesztett, lézerindukált klorofill-a-fluoreszcencia detektálásán alapuló hordozható *FluoroMeter Modul (FMM)* készülékkel végeztük el (4. ábra). A műszer mérési elve az ún. „Kautsky effektuson” alapszik (KAUTSKY és HIRSCH 1931).

A vizsgálatokat 96-lyukú teljesen fekete mikrotálcákon végeztük el, amelyek során a vizsgált mintákból 250 µl mennyiséget pipettáztunk a mikrotálca adott lyukaiba. A mintával feltöltött lyukakkal szomszédos cellákba a méréseket megelőzően 250 µl desztillált vizet adagoltunk. A sötétadaptáció során a feltöltött mikrotálcákat egy speciális, fénykizáró, mattfeketére festett, fából készült mintatartóba helyeztük (BME fejlesztése, 4. ábra), amelyben biztosítani tudtuk a teljesen fénymentes körülményeket. A 10-perces sötétadaptáció után a készülék egy 10 mW teljesítményű lézerdiódával 635 nm hullámhosszon gerjeszti a mintát. A

gerjesztést követően a mérés időtartama 5 perc volt, amely során a minta által emittált fluoreszcens fény intenzitását 690 nm és 730 nm hullámhosszokon detektáltuk (BARÓCSI *et al.* 2009). A méréseket minden minta esetében kétszer ismételtük meg. A készülék által mért adatok a *FluorMeas* szoftverrel grafikusan is megjeleníthetők. Vizsgálataink során a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát (F_v/F_p), amely a maximális fluoreszcencia (F_p) és az ún. változó fluoreszcencia hányadosa, továbbá a fotoszintetikus aktivitást jellemző vitalitásindex (*fluorescence decrease ratio*, Rfd) változásait vizsgáltuk. Az Rfd -érték az F_p és a stacionárius fázisban elért (terminális) fluoreszcens intenzitás (F_s) értékek különbségének és az F_s -érték hányadosaként adható meg.



4. ábra Algasejtek fotoszintetikus aktivitásának meghatározása *FluoroMeter Modul* készülék alkalmazásával (saját fotó)

A fitotoxikus hatások jellemzése során a 690 nm hullámhosszon mért értékeket hasonlítottuk össze (BARÓCSI *et al.* 2000). A kezelések hatásait a vizsgált algaszuszpenziók fotoszintetikus aktivitására az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) használatával értékeltük ki, majd hasonlítottuk össze. A vizsgált anyagok különböző koncentrációinak hatását az F_v/F_p - és Rfd -értékekre általános lineáris modellel elemeztük. Az adatok normalitását minden esetben diagnosztikai ábrákkal (reziduális varianciák, *QQ-plot*, Cook-féle távolság ábra) ellenőriztük.

3.4. Közösségi szintű vizsgálatok biofilmekben

Közösségi szintű vizsgálataink során hazai felszíni folyó- (Duna) és állóvíztestekben (Balaton, Velencei-tó) természetes körülmények között kialakuló biofilmekben laboratóriumi körülmények között vizsgáltuk a ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek hatását a biofilmek algaközösségeinek algabiomassájára és összetételére, valamint a biofilmek szerkezetére.

3.4.1. *Felszíni vízi biofilmek természetes körülmények között történő növesztésének módszere*

A felszíni vízi biofilmek nagyfokú előhely-specifitást mutatnak, ezért a vizsgálatokat megelőzően hazai felszíni vizekben (Duna, Balaton, Velencei-tó) az adott élőhelyre jellemző biofilmeket növesztettünk. A biofilmnövesztés üveglapokon valósult meg, amelyeket egy speciális bójás szerkezet segítségével helyeztünk ki a kolonizáció helyszínére. A bójás szerkezet [a NAIK AKK (jogutódja: MATE KÖTI AKK) Dr. Darvas Béla, Cséffán Tamás és Pasaréti Gyula által kifejlesztett, AKK-1-típusú algabója (5. ábra)], összesen 24 db üveglap (méret: 23x9 cm, vastagság: 3 mm) stabil elhelyezését teszi lehetővé hatos egységekben (kazettákban) (5. ábra). A fejlesztői munka a biofilmvizsgálatokban publikált szerkezetek tanulmányozását követően Dr. Darvas Béla vezetésével valósult meg, amelyben segítségünkre voltak az MTA ÖK Duna-kutató Intézet (DKI) [jogutódja: ELKH ÖK Vízi Ökológiai Intézet (VÖI)].

Az üveglapegységeket tartó kazettákat (összesen 4 db kazetta, egyenként 6-6 db üveglap függőleges helyzetű befogadására alkalmas) a bója középvonalában elhelyezett vízszintes lapon rögzítettük. A rögzítő lapot 4 db függőleges láb tartja, melyeket hosszanti és széli irányban is üreges hasáb vagy henger alakú testek kötnek össze. Utóbbiak szerepe a merevítés mellett, hogy a bóját úszóelemként a vízben lebegve tartsák, olyan stabil pozícióban, hogy a kazettákban elhelyezett üveglapok tartósan 20–30 cm-re a vízfelszín alatt maradjanak. A kazettákat és az úszótesteket oldható kötéssel (csavarmenettel) rögzített merevítő rudak tartják és támasztják ki. A bóján elhelyezett egységek így párhuzamosan 4x6 db üveglap azonos körülmények közötti elhelyezését biztosítják, elősegítve az egységes biofilmképződést az üveglapokon (5. ábra).

Az üveglapok egyik oldala homokfűvott, míg a másik sima felületű, így a vizsgálatok során a két különböző oldalakon kialakult biofilmek összehasonlítására is sor került a biofilmnövesztési periódust követően. A kísérletek laboratóriumi szakaszában előnyös, hogy az egységek egyénileg is mozgathatóak, így 4-féle kísérleti beállítás vizsgálható 6 ismétlésben (6 egyedi üveglap/egység a kontroll- és kezelt csoportokban egyaránt), továbbá egy szintén anyagában *inert* kiemelő szerkezettel az egységeken elhelyezett üveglapok is zavartalanul

laponként kezelhetők, amely a különböző vizsgálatok esetében kiemelt fontosságú, mivel a mérési pontok így műszeresen is könnyen megközelíthetők. Az üveglapok egymástól kb. 2 cm-re helyezkedtek el az egységekben. Az üveglapokon további 1x1 cm méretű homokfűvott üvegkockalapokat is elhelyeztünk a kialakult biofilmek elektronmikroszkópos feldolgozásához.



5. ábra Az AKK-1-típusú algabólya szerkezete (fotó: Pasaréti Gyula)

A bóják kialakításakor fontos szempont volt, hogy a szerkezet alkalmazkodjon a vízszint változásához, továbbá, hogy a bója stabilan rögzíthető legyen a parton található tereptárgyakhoz és a nyílt vízben egyaránt, folyóvízi és állóvízi környezetben is. A kialakított bójás szerkezet minden eleme könnyen és megfelelő módon tisztítható és szükség szerint csírátlanítható (UV-sugárzás, hidrogén-peroxid). A bója anyagát tekintve nem tartalmaz olyan fém- vagy műanyag-összetevőt/alkatrészt, amely esetlegesen befolyásolhatná a laboratóriumi körülmények között beállított kísérleteink eredményeit, hitelességét, továbbá helyes anyagmegválasztással kizárható a különböző hormonmoduláns hatások megjelenése is. A hathetes biofilm-kolonizációt követően az üveglapokon keletkezett biofilmeket a természetes vizekből kiemelve és a bójás szerkezetről leválasztva szállítottuk a MATE KÖTI AKK laboratóriumába. A biofilmvizsgálataink során felhasznált felszíni vízi biofilmek növesztésének körülményeit a 4. melléklet mutatja be.

A 2015. évi biofilmnövesztési periódusban folyamatosan, heti rendszerességgel mintavételeztük a vizsgált víztesteket, amelyek során meghatároztuk a vízminék pH-értékét és bizonyos növényvédőszer-maradékok jelenlétét is. Az analitikai vizsgálatok során 49 különböző

növényvédőszer-hatóanyag jelenlétét mértük a természetes felszínivízmintákban (Balaton, Duna) a biofilm-kolonizáció és a laboratóriumi expozíció teljes időtartama alatt. A célvegyületek kiválasztása felhasználásuk és perzisztenciájuk alapján történt. A különböző hatóanyagok kimutatása többnyire gázkromatográfiás módszerrel történt, azonban a neonikotinoid-típusú hatóanyagok és a *glyphosate* meghatározását nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel végeztük el.

3.4.2. A biofilmvizsgálatok során alkalmazott kísérleti elrendezés és kezelések

A természetes körülmények között növesztett biofilmeket a növesztési periódust követően a természetes vizekből kiemelve a MATE KÖTI AKK Ökotoxikológiai Osztályának klimatizált laboratóriumi helységébe ($T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$) szállítottuk, ahol az előzetesen megtervezett és méretezett üvegakváriumokat (kb. $80 \times 40 \times 40$ cm) feltöltöttük a biofilmnövesztés helyéről származó élővízzel (kb. 15 l). Minden akváriumba 5 db üveglemezt helyeztünk el (6. ábra), mivel a 6. lemezt a kovaalga-közösség faji szintű meghatározására használtuk fel. Az akváriumok vizét mágneses keverőkkel folyamatosan keringettük, elősegítve a megfelelő oxigénmennyiség beoldódását, továbbá 3-szakaszos fényperiódusokat állítottunk be (6:00–9:00 400 lux, 9:00–18:00 2000 lux, 18:00–21:00 400 lux) (XiLong White T8 fénycsövek, AkváriumPlus, Budapest), hogy a környezeti fényviszonyok minél pontosabban szimulálhatók legyenek. A fényerősséget heti szinten ellenőriztük (Light Meter MS-86, Dostmann, Wertheim-Reicholzheim, Németország). A vizsgálat teljes időszaka alatt hetente teljes vízcserét végeztünk a biofilm-kolonizáció helyszínéről származó természetes vízzel. A vízcserék során ügyeltünk arra, hogy minden egység a kezeléseknek megfelelő, eredeti helyére és az üveglapok meghatározott sorrendjének megfelelően azonos pozícióba kerüljön vissza az akváriumokba. A szükséges vizsgálatokat és mintavételeket heti szinten végeztük el. A kísérlet a minták analitikai és algológiai vizsgálatával, majd az eredmények statisztikai kiértékelésével zárult.

A hatások értékelése minden esetben kontrollegységek beállítása mellett történt, amelyek fenntartását a kezelt egységekhez hasonlóan a biofilm növesztésének helyéről származó 15 l természetes vízben, valamint azonos környezeti körülmények között és a heti rendszerességű teljes vízcserék alkalmazása mellett valósítottuk meg. A GLY hatásait tiszta hatóanyag (GLY-IPA) és formázott készítmény (ROUNDUP CLASSIC) formájában POEA jelenlétében is vizsgáltuk. A vizsgálatok során alkalmazott GLY-koncentráció 100 $\mu\text{g/l}$ GLY-IPA (74,1 $\mu\text{g/l}$ GLY szabad savnak felel meg), amely ugyan európai és hazai környezetünkben nem tekinthető általánosnak, azonban azokon a területeken, ahol a GLY-toleráns GM-növények termesztése, valamint a GLY-

tartalmú készítmények állományszárítási célra való felhasználása jelentős, a *GLY* koncentrációja elérheti akár az 5 mg/l-es nagyságrendet is (EDWARDS *et al.* 1980, COUPE *et al.* 2012).



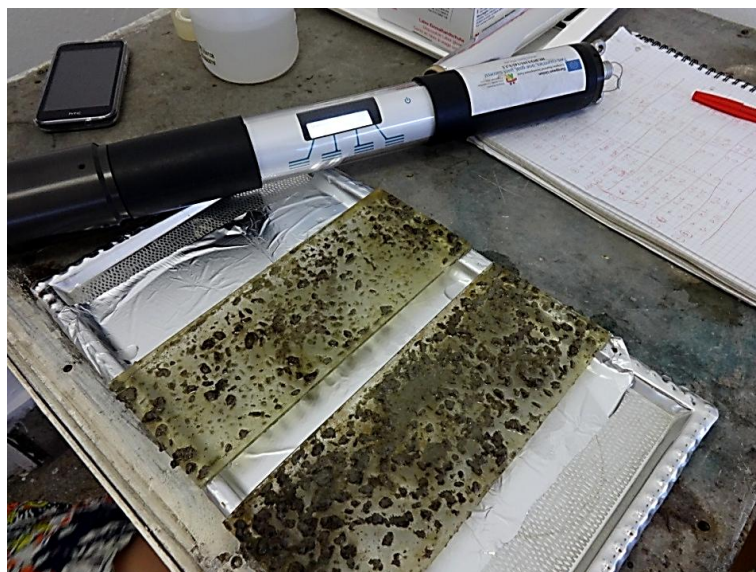
6. ábra A természetes körülmények között kialakult biofilmek elhelyezkedése laboratóriumi körülmények között (saját fotó)

A 2016. évi vizsgálatok során a *POEA* egyedi toxicitásának vizsgálatát is elvégeztük, az alkalmazott koncentráció (37,4 $\mu\text{g/l}$ *POEA*) a vizsgált *GLY*-koncentrációnak megfelelő mennyiségű készítményben megtalálható *POEA*-tartalommal ekvivalens formázóanyag-mennyiség. Az expozíció során alkalmazott heti vízcserék során a kezelésekben alkalmazott koncentrációk ismételt beállítására is sor került. A kezelések biofilmekre gyakorolt hatásait az akváriumban elhelyezett üveglapok számának megfelelően 5 ismétlésben vizsgáltuk. A 2015 és 2016 között elvégzett biofilmvizsgálataink jellemzőit a 4. melléklet foglalja össze.

3.4.3. Biofilmek algabiomassájának és szerkezetének vizsgálati módszerei

A biofilmek algaközösségeinek biomasszájára gyakorolt hatásokat algafáklya (bbe Moldaenke BentoTorch, Schwentinental, Németország) használatával elvégzett *in situ* mérések alapján értékeltük (7. ábra). Az algafáklyás méréseink során az MTA ÖK DKI (jogutódja: ELKH ÖK VÖI) munkatársai voltak segítségünkre. A pulzáló amplitudó alapelven működő fluoriméter az *FMM*-hez hasonlóan szintén az *in vivo* klorofill-a-fluoreszcenciát detektálja, több hullámhosszon (470, 525, 610 és 700 nm) történő gerjesztés mellett. A felületen megtapadó bentikus algák *in vivo* fluoreszcenciájának detektálása 690 nm-en történik. A mérési tartomány: 0–15 μg klorofill-a/ cm^2 , míg kimutatási határa: 0,1 μg klorofill-a/ cm^2 . A vizsgálatok során

alkalmazott algafáklya az algaközösségek fajösszetételének és a teljes algabiomassza *in situ* meghatározására alkalmas berendezés. Az algafajok diverzitásának vizsgálata során a zöld-, kék- és kovaalgafajok arányát becsüli a műszer a különböző algacsoportok klorofill-a-tartalma, a fluoreszcens jel intenzitása és a beépített algoritmusok alapján. A vizsgált felület területe: 9,6 cm², amely során a teljes algabiomassza és a különböző algacsoportok mennyiségét a műszer felületegységre vonatkozott klorofill-a-tartalomban fejezi ki [μg klorofill-a/cm²] (CARPENTIER *et al.* 2013, BBE MOLDAENKE 2020).

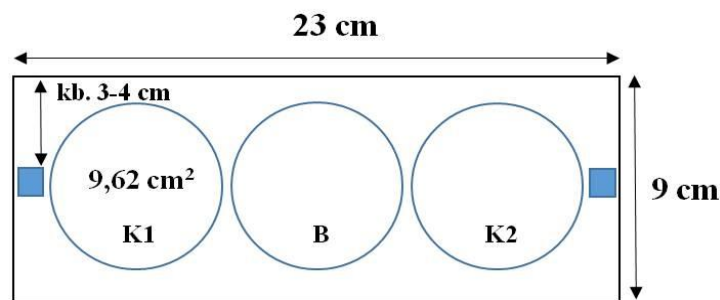


7. ábra A természetes körülmények között kialakult balatoni biofilmek vizsgálata laboratóriumi körülmények között algafáklya használatával (saját fotó)

Az algafáklya által meghatározott fajösszetételekre vonatkozó adatok azonban csak kellő elővigyázatossággal mellett használhatók fel, ugyanis egy 2014-ben közölt tanulmányban az algabiomassza mennyiségi becslése során a hagyományos klorofillextrakciós módszerrel és az algafáklyával detektált fluoreszcens jel intenzitása alapján meghatározott klorofill-a-tartalomban nem tapasztaltak különbséget. Az algaközösség összetételének jellemzése során azonban jelentős eltéréseket figyeltek meg a hagyományos mikroszkópos fajmeghatározás és az algafáklyával végrehajtott mérések között, így az algafáklya által meghatározott fajösszetételekre vonatkozó adatok csak körültekintéssel mellett használhatók fel (KAHLERT és McKIE 2014). Az algafáklyás mérések minden adatsort azonos mértékben jellemző hibaszintjei mellett a készülék jól alkalmazható a különböző összehasonlító vizsgálatokban. Saját vizsgálatainkat megelőzően ellenőriztük, a klorofill-a-tartalom meghatározására alkalmazott alkoholos extrakciót követő spektrofotometriás (ISO 1992) és az algafáklyával kivitelezett mérések eredményeinek összehasonlítása során. A biofilmek klorofill-a-tartalmának meghatározása során az üveglapok

homokfűvott oldalának teljes felületéről (207 cm^2) rövid sertéjű kisméretű kefével ledörzsöltük, majd 50 ml desztillált vízbe mostuk bele az eltávolított biofilmréteget. Az így kapott biofilmszuszpenziókból (50 ml) centrifugálást követően kivontuk a klorofilltartalmat, az alkoholos extrakcióhoz 20 ml 96% etanolt használtunk fel. A klorofill-a-tartalom meghatározását a lebegő algafajok esetében bemutatott módszerrel végeztük el (lásd 3.3.2. fejezet), minden minta esetében 3 ismételtsben. A két módszer között igen magas korrelációt ($R^2 > 0,999$) tapasztaltunk a vizsgált tartományban ($1\text{--}50 \text{ }\mu\text{g/ml}$).

Az algafáklyás vizsgálatokat az összes kontroll- és kezelt lemez homokfűvott és sima felületén 2015-ben kettő [egy külső (K1) és a belső (B) mérési pont/oldal], míg 2016-tól három mérési pontban [két külső (K1, K2) és a belső (B) mérési pont/oldal] végeztük el (8. ábra). A mérési pontok minden lemez esetében egyedileg azonosíthatók, mivel a lemezek pozícióját nem változtattuk meg a méréseket követően. A biofilmek algaközösségeinek biomasszáját jellemző paraméterek meghatározását a vizsgálat elején az expozíciót megelőzően és a teljes expozíció során a vízcseréket megelőzően kéthetente végeztük el.



8. ábra A biofilmvizsgálatok során alkalmazott üveglapok mérete és az üvegkockalapok, valamint a külső (K1, K2) és belső (B) mérési pontok elhelyezkedése

Az algafáklya által algacsoportonként (zöldalga, cianobaktérium, kovaalga) meghatározott adatokat (μg klorofill-a/ cm^2) minden mérési pontban összeadtuk, mivel az így kapott összklorofill-a-tartalom jellemzi adott mérési pontokban az algaközösség biomasszáját, amely értékek képezték a statisztikai modellezés és kiértékelés alapját. A mérési adatok alapján a vizsgált kontroll- és kezelt biofilmek esetében a biofilmek algaközösségeinek összetételét és az algacsoportban bekövetkező változásokat kördiagramokon, majd az adatok statisztikai kiértékelése során a különböző algacsoportok arányait kétmintás z-próbával hasonlítottuk össze 5%-os szignifikanciaszinten az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) használatával.

A biofilmek algabiomasszájára gyakorolt hatások kiértékelése szintén az R 4.0 statisztikai programmal (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) történt. Az alkalmazott általános lineáris modellekben különböző paraméterek hatásait vizsgáltuk a BM-

értékekre (a kialakult biofilmek algaközösségének biomasszáját jellemző érték, amely az algafáklya által különböző mérési pontokban algacsoportonként meghatározott klorofill-a-adatok összege). A kísérleti rendszerben potenciális magyarázó változók lehetnek, többek között a biofilm-kolonizáció helye (Balaton, Duna, Velencei-tó) és időpontja (év: 2015, 2016), amelyek hatással vannak a kialakult biofilm-algaközösség fajkészletére és kezdeti biomasszájára [$BM(t_0)$: a kezdeti időpontban (az expozíciót megelőzően) meghatározott BM-érték], de a különböző víztesteket jellemző fizikai-kémiai paraméterek is hatással lehetnek a hatásokra. Az üveglapokon kialakuló biofilmek algaközösségeinek fajkészletére és kezdeti biomasszájára hatást gyakorolhat továbbá az üveglap felülete (sima, homokfűvott) és az üveglapok mérési pontjainak elhelyezkedéséből adódó potenciális szegélyhatás (külső, belső mérési pontok, 8. ábra).

A modellalkotás során mindig egy egyszerűbb lineáris alapmodellből indultunk ki, amelyben vizsgáltuk a kolonizáció során kialakult kezdeti biomasszájának [$BM(t_0)$], az időnek, a mérési pont elhelyezkedésének (külső/belső), a felületnek (homokfűvott/sima), a kezelésnek (*GLY*, *ROUNDUP CLASSIC*, *POEA*) és az idő kezeléssel együttes interakciójának az adott mérési pontokban kialakult BM-értékekre gyakorolt hatásait. A különböző víztestekben és években kialakult biofilmek esetében a modelleket a modelleredmények (paraméterek), a modell illeszkedése és a diagnosztikai ábrák segítségével finomítottuk a paraméterek eltávolításával, hozzáadásával, transzformálásával és különböző interakciók alkalmazásával. A végső modellben mindig az volt a cél, hogy a modell feltételei teljesüljenek (diagnosztika), a modell jól illeszkedjen (R^2) és ne legyen túlparametrizálva, tehát ne legyenek benne kis információtartalmú, hatással nem rendelkező paraméterek, ez utóbbit a p-értékek és a modellek AIC-értéke (Akaike-féle információs kritérium) alapján döntöttük el.

A statisztikai kiértékelés során külön modellekben vizsgáltuk a rövid és hosszú távú hatásokat. A rövid távú hatások vizsgálata során a 0. és 2. hét között tapasztalható változásokat, míg a hosszú távú hatások esetében a 4. héttől megfigyelhető jelenségeket értékeltük. A mérési pontokban meghatározott BM-értékek alapján az adatértékelés során minden kontroll- és kezelt egységben összehasonlítottuk az üveglapok sima és homokfűvott felületein kialakult algaközösség biomasszájának mennyiségét, továbbá értékeltük a vizsgálatba vont egységek homogenitását és az egységek szélső lemezein, továbbá a lemezek szélein érvényesülő szegélyhatás mértékét.

A 2015-ben növesztett biofilmek szerkezetében a kezelések hatására bekövetkező változásokat pásztázó elektronmikroszkópos (*SEM*) technikával vizsgáltuk. A szerkezetvizsgálatok során az expozíciót megelőzően és a kísérlet végén 3-3 üvegekockalapot gyűjtöttünk be a kontroll- és kezelt egységekben elhelyezett üveglapokra a kolonizációt megelőzően felragasztott üvegekockák közül. A biofilmmintákat a *SEM*-vizsgálatot megelőzően

glutáraldehides módszerrel fixáltuk, majd a minták liofilizálását követően a SEM-vizsgálatokat Dr. Ács Éva [MTA ÖK DKI (jogutódja: ELKH ÖK VÖI)] végezte el. A szerkezetben megfigyelhető változások 15 véletlenszerűen kiválasztott mező áttekintésével és a kontrollcsoportban megfigyelhető szerkezeti struktúrákhoz, mint negatív kontrollhoz történő összehasonlítás során kerültek meghatározásra.

3.4.4. Balatoni és dunai biofilmek kovaalga-közösségein elvégzett vizsgálatok

A 2015. évi biofilmek vizsgálata során a GLY biofilmek kovaalga-közösségeinek összetételére gyakorolt hatásait is meghatároztuk tiszta hatóanyag (GLY-IPA) és formázott készítmény (ROUNDUP CLASSIC) formájában. A vizsgálatok során az expozíciót megelőzően, majd 6 és 10 hét elteltével a vizsgálat végén minden kontroll- és kezelt egységből kiemeltünk 1-1 azonos pozícióban lévő üveglapot, ezt követően az üveglapok mindkét oldalának teljes felületéről (414 cm^2) – a 3.4.3. pontban leírtakhoz hasonlóan – rövid sertéjű kisméretű kefe használatával ledörzsöltük, majd 50 ml desztillált vízbe mostuk bele az eltávolított biofilmréteget. Az összegyűjtött biofilmmintákból 25-25 ml-t gyűjtöttünk össze 25 ml-es centrifugacsövekbe. A mintákban hagyományos mikroszkópos módszerrel az MTA ÖK DKI (jogutódja: ELKH ÖK VÖI) munkatársai – Földi Angéla és Trábert Zsuzsa határozták meg faji szinten a kovaalga-közösség összetételét. A részünkre eljuttatott fajlisták és a meghatározott relatív egyedszámok alapján végeztük el a kovaalga-közösségek biológiai jelleg-alapú (*trait*-alapú) vizsgálatát (RIMET és BOUCHEZ 2011, 2012). A kovaalga-közösség összetételében a kezelések hatására bekövetkező változásokat minden esetben a kontrollcsoportéhoz hasonlítva értékeltük a különböző mintavételi időpontokban.

A kovaalga-közösség biológiai jelleg-alapú vizsgálata során a kovaalgafajokat a kiválasztott biológiai jellegek alapján jellemeztük és csoportosítottuk. A kiválasztott biológiai jellegek: a sejtméret és az ökológiai *guild*-ek voltak. A sejtméret alapján történő csoportosítás során a fajokat 5 csoportba osztályoztuk, amelyekben a sejt térfogata $< 99 \mu\text{m}^3$ (c1), $100\text{--}299 \mu\text{m}^3$ (c2), $300\text{--}599 \mu\text{m}^3$ (c3), $600\text{--}1499 \mu\text{m}^3$ (c4) vagy $> 1500 \mu\text{m}^3$ (c5). A biológiai jelleg-alapú vizsgálati módszert alkalmazó közleményekben (RIMET és BOUCHEZ 2011, 2012) az ökológiai *guild* jelentése tágabb értelemben véve azon taxonok csoportjait foglalja magában, amelyek ugyanazokat az erőforrásokat használják ki, és ugyanabban a környezetben élnek, de ugyanazon abiotikus tényezőkhez különböző módon alkalmazkodnak. A kovaalgák esetében a különböző *guild*-ek meghatározása és elkülönítése a különböző élőhelyeken (a biofilm különböző rétegeiben) környezeti grádiensek (tápanyag-grádiens, áramlási sebesség-grádiens) alapján történik. A vizsgálatok során alkalmazott ökológiai *guild*-ek: az alacsony profilú (*low*

profile, LP), magas profilú (*high profile, HP*), mozgásra képes (*motilis*) morfológiájú (*motile, MO*) és planktonikus (*planktic, PL*) *guild*-ek. Az *LP guild*-hez tartozó fajok a bevonat alsó rétegeiben helyezkednek, ahová sokkal kevesebb fény és tápanyag jut, viszont a külső zavarásokkal (pl. áramlási sebesség) szemben jóval védettebbek. A *HP guild* fajai a bevonat felső rétegeiben helyezkednek el, így könnyen hozzáférnek a tápanyagokhoz és a fényhez, behatásokra viszont igen érzékenyen reagálnak. A *MO guild* tagjai helyváltoztatásra képesek, így a számukra legalkalmasabb élőhelyet foglalják el a bevonaton belül, míg a *PL guild*-ben megtalálható taxonok a lentikus környezethez alkalmazkodtak (PASSY 2007a, RIMET és BOUCHEZ 2011, 2012). A kovaalgafajok biológiai jelleg-alapú osztályozását az OMNIDIA 6.0. szoftverrel (IRSTEA, Bordeaux, Franciaország), továbbá különböző tanulmányok és elérhető adatbázisok alapján végeztük (RIMET *et al.* 2016, 2018, 2019, LIFEWATCH BELGIUM 2020, TAXASERVICE 2020).

A kovaalgafajok biológiai jelleg-alapú vizsgálata az elkészített adatbázisok statisztikai kiértékelésével és összehasonlításával zárultak. A statisztikai elemzés során a különböző biológiai jellegekbe sorolt taxoncsoportok eloszlását Fisher-féle egzakt teszttel 5%-os szignifikanciaszinten hasonlítottuk össze, az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) alkalmazásával. A kiválasztott biológiai jellegeknek megfelelően kialakított csoportok eloszlását a fajsza- és sejtszámarányok alapján is értékeltük, gyakorisági táblázatok elkészítését követően.

3.5. Analitikai vizsgálatok

Az ökotoxikológiai vizsgálataink mellett, környezetanalitikai módszerekkel követtük a *GLY* és a neonikotinoid-típusú készítményekben felhasznált *LAS* lebomlását különböző felszínivízmintákban és kísérleti beállítások mellett. A célvegyületek mennyiségi meghatározása a mérési tartományban előzetesen felvett kalibrációs görbék alapján történt.

3.5.1. A glyphosate lebomlásának vizsgálata felszínivízmintákban

A *GLY* lebomlását tiszta hatóanyag (*GLY-IPA*) és formázott készítmény formájában (ROUNDUP CLASSIC) vizsgáltuk balatoni és dunai vízmintákban. A *GLY* lebomlásának kinetikáját biofilmek jelenlétében is meghatároztuk a 2015-ben végzett biofilmvizsgálatok során (lásd 3.4.2. fejezet, 4. melléklet), tehát a *GLY* lebomlását a biofilmnövesztés helyéről származó természetes vízmintákban vizsgáltuk. A lebomlási kísérletek során a biofilmeket tartalmazó akváriumok mellett további 2-2 akváriumot állítottunk be a természetes vízmintáknak, valamint a

hatóanyagnak és a formázott készítménynek megfelelően, amelyeket a kezeléseknek megfelelően előzetesen 15 l természetes vízzel töltöttünk fel. A kiindulási koncentrációk beállítását követően, az akváriumokat a biofilmes akváriumok esetében is alkalmazott körülmények között tartottuk fenn ($T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$, folyamatos kevertetés, 3-szakaszos fényperiódus az akváriumok megvilágítása során), azzal a különbséggel, hogy az akváriumokba nem helyeztünk biofilmeket. A lebomlásvizsgálatokban beállított kiindulási GLY-koncentráció a biofilmvizsgálatokhoz hasonlóan $100 \mu\text{g/l}$ ($74,1 \mu\text{g/l}$ GLY szabad sav) volt. A GLY lebomlását biofilmek jelenléte nélkül egy héten keresztül napi szintű vízmintavétel mellett vizsgáltuk a hatóanyag és a formázott készítmény esetében is, míg biofilmek jelenlétében a teljes expozíciós időszakban nyomon követtük a GLY koncentrációjának alakulását. A kezdeti koncentrációk beállítását követően az első héten szintén naponta, majd hetente a vízcsereket megelőzően és a koncentrációk ismételt beállítását követően is elvégeztük a vízminták begyűjtését. A mintavételek során a vízmintákat (15 ml) mindig a koncentrációk beállítását követően 30 perc elteltével gyűjtöttük be, három ismétlésben, annak érdekében, hogy a vizsgálati anyagok egyenletesen elkeveredjenek a vizsgált víztömegben. A vízmintákat a feldolgozásig -24°C -on fagyasztva tároltuk (BYER *et al.* 2008, KYLIN 2013).

A minta-előkészítés (5 ml vízminta) során első lépésben $250 \mu\text{l}$ FMOC-Cl oldat ($0,5 \text{ mM}$) és $0,3 \text{ ml}$ borátpuffer ($\text{pH} = 9$) felhasználásával származékképzést végeztünk (NEDELKOSKA és LOW 2004). A minták alapos összerázását és egyórás, szobahőmérsékleten történő inkubációját követően, folyadék–folyadék-extrakcióval 3 ml diklór-metán alkalmazásával a szerves réteg eltávolításával kivontuk a mintából a felesleges származékképző reagenst, ezt követően szilárd fázisú extrakciót végeztünk (HANKE *et al.* 2008). A szilárd fázisú extrakció során a szorbenseket 5 ml metanol, majd $5\text{-}5 \text{ ml}$ desztillált víz és foszfátpuffer hozzáadásával ($\text{pH} = 3$) kondicionáltuk, ezt követően hozzáadtuk az előkészített 5 ml vízmintát. A minta hozzáadását követően 3 ml desztillált vízzel mostuk át a szorbenseket három ismétlésben. A levegőn kiszáritott szorbensekről ezt követően $3,5 \text{ ml}$ metanol hozzáadásával leoldottuk a célvegyületet. A minták bepárlását követően, az alkalmazott folyadékkromatográfiás módszernek megfelelő eluensben (acetonitril és nátrium-acetát) történt a minták visszaoldása, majd a mintákat $0,45 \mu\text{m}$ -es hidrofíll politetrafluoretilén fecskendőszűrőkön szűrtük át.

A minták GLY-tartalmát HPLC módszerrel határoztuk meg fluoreszcens UV detektálás mellett (HPLC-UV) (NEDELKOSKA és LOW 2004, KÜSTERS és GERHARTZ 2010), azonban ahol a GLY-koncentráció már a HPLC-UV detektálás kimutatási határa ($\text{LOD}: 5 \mu\text{g/l}$) alá esett, az analízist folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) módszerrel ($\text{LOD}: 1 \text{ ng/l}$) is elvégeztük (BYER *et al.* 2008, HANKE *et al.* 2008), ahol szintén a fentebb ismertetett minta-előkészítést alkalmaztuk. A HPLC-UV analíziseket automata

mintaadagolóval (YL9150) ellátott YL9100 HPLC készülékkel (Young Lin Instrument Co., Ltd., Anyang, Dél-Korea) végeztük el, amelyben a GLY elválasztása Chromegabond WR C₁₈ oszlopokon (ES Industries, Berlin. Németország) 40°C-on történt, míg a jelek detektálása 260 nm hullámhosszon valósult meg. Az eluens áramlási sebessége gradiens elúció alkalmazása mellett 0,7 ml/min volt. A kezdeti eluensarány (1:9 = A:B eluensek, A = 100% acetonitril, B = 10 mM Na-acetát-puffer, pH = 6,0) az A eluens arányát 90%-ra emeltük a 6. percre, 3 percig tartottuk, majd 1 percen belül visszatértünk az eredeti összetételhez, amit további 3 perc ekvilibrálás követett. Az injektált mintamennyiség 30 µl volt.

Az LC-MS/MS vizsgálatokat egy Thermo-Finnigan TSQ-20003 Quantum Discovery MAX folyadékkromatográfiás berendezéssel (Thermo Electron Corp., San Jose, CA, Egyesült Államok) végeztük el, amelyhez egy elektropray ionizációs hármas kvadrupól tömegspektrométer volt csatlakoztatva. A GLY elválasztása Kinetex XB C₁₈-oszlopokon (Phenomenex, Gen-Lab Ltd., Budapest) 25°C-on történt. A gradiens elúció 0,2 ml/min áramlási sebesség mellett valósult meg. Az alkalmazott eluensek: hangyasav vizes oldata (0,1%, A eluens) és acetonitril (B eluens). A mérések végrehajtása előtt az eluenseket regenerált cellulózsűrőn szűrtük át (0,2 µm). Az eluensek összetétele a következőképpen alakult a mérések során: a 2. percig 3% B, majd ez a 10. percre 50%-ra emelkedett és a 15. percre 3%-ra állt vissza a B eluens aránya, amit további 10 perc ekvilibrálás követett.

A biofilm jelenlétében végzett lebomlásvizsgálatokban a GLY-koncentráció alakulását a kezeletlen és kezelt biofilmcsoportok teljes algabiomasszájában megfigyelhető változások figyelembe vételével értékeltük. Az összbiomassza meghatározása során az algafáklya által egy mérési pontban mért terület (9,6 cm²) vettük alapul, így a lemezeken lemért összterület két mérési pont esetén 38,4 cm² volt, az összesen lemért terület pedig így egy akváriumban, 5 lemez esetén 192,0 cm². A biofilmek összterülete az akváriumokba helyezett üveglapokon: 2070 cm². Az összbiomassza meghatározása során a lemért terület biomasszáját a biofilm borította területre extrapoláltuk.

3.5.2. *A lineáris alkil-benzol-szulfonátok lebomlásának vizsgálata vizes közegben*

A neonikotinoid-készítményekben felhasznált LAS lebomlását tiszta detergenskeverék (C₁₀₋₁₃) és formázott készítmény formájában (MOSPILAN 20 SG) 27 napon keresztül vizsgáltuk desztillált vízben és a Dunából származó felszínvízmintákban. Kísérleteink során a LAS lebomlásának kinetikáját 14 napon keresztül különböző neonikotinoid-típusú hatóanyagok [ACE, CLO, imidacloprid (IMI), TCL, TMX)] jelenlétében is vizsgáltuk, de csak dunai vízmintákban.

A LAS degradációjának vizsgálatát a Wang és munkatársai (2010) által bemutatott biodegradációs vizsgálatokhoz hasonlóan végeztük el. A lebomlási kísérletek során felhasznált természetes folyóvizet a Duna budapesti szakaszáról frissen gyűjtöttük („Zöld-sziget” úszómű, 47.481641, 19.057645) a kísérletek beállításának napján. A lebomlásvizsgálatokat 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokban végeztük el. A LAS lebomlását minden minta esetében 3 ismétlésben vizsgáltuk, tehát minden vizsgálati beállítás esetében 3-3 lombikban kerültek beállításra a vizsgált kiindulási koncentrációk a természetes vízmintákban és desztillált vízben egyaránt. A lebomlásvizsgálatokban beállított kiindulási LAS-koncentráció 14,4 mg/l volt a tiszta detergenskeverék és a formázott készítmény esetében is. Az alkalmazott koncentrációt a *D. magna* tesztszervezeten elvégzett akut vizsgálatok eredményei alapján választottuk ki, amelyek alapján a kiválasztott koncentráció már toxikus hatást gyakorolt a *D. magna* immobilizációjára. A neonikotinoid-típusú hatóanyagok jelenlétében elvégzett lebomlásvizsgálatokban a vizsgált hatóanyagok kiindulási koncentrációi a következőképpen alakultak: ACE: 120 mg/l, CLO: 134,5 mg/l, IMI: 137,8 mg/l, TCL: 136,2 mg/l, TMX: 157,2 mg/l. A hatóanyagok kezdeti koncentrációit a MOSPILAN 20 SG összetételében feltüntetett hatóanyag (ACE) arányának megfelelően határoztuk meg, tehát az összes hatóanyag esetében azonos volt a mol/l értékben kifejezett koncentráció (0,0005 mol/l). A kísérletek során minden lombikba 50 ml desztillált vagy 50 ml dunai vízminta került. A természetes folyóvízből a felhasználást megelőzően nem szűrtük ki az oldott részecskéket és mikroorganizmusokat (baktériumokat, algasejteket), így biztosítva a természetes körülmények között fennálló degradációs utak kialakulását a tesztedényekben. A vizsgált felszínivízminták főbb jellemzői a vizsgálati periódus során: $T = 18 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,2 \pm 0,2$, oldott oxigéntartalom: $0,6 \pm 0,7$ mg/l, oldott foszfáttartalom: $0,06 \pm 0,01$ mg/l, összes nitrogéntartalom: $2,9 \pm 0,4$ mg/l, klorofill-a-tartalom: $0,017 \pm 0,006$ mg/l. A kiindulási koncentrációk beállítását a vizsgált anyagok frissen elkészített törzsoldataival végeztük el, amelyet követően a lombikokat nem dugaszoltuk le, de óvtuk a közvetlen fénytől a kísérlet teljes időtartama során Wang és munkatársai (2010) ajánlásainak megfelelően.

A kísérleti koncentrációk beállítását követően 3, 6, 9, 12, és 24 óra elteltével, majd 2-3 naponta került sor a vízminták (1 ml) begyűjtésére. A minták folyadékkromatográfiás meghatározást megelőzően a mintákat $0,22\ \mu\text{m}$ -es politetrafluoretilén-fecskendőszűrőkön szűrtünk át. A vizsgált vízminták LAS-tartalmát fluoreszcens detektálással HPLC-UV technikával határoztuk meg. Automata injektorral (YL9150) ellátott YL9100 HPLC készülék (Young Lin Instrument Co., Ltd., Anyang, Dél-Korea) alkalmazásával, a LAS elválasztása (Acclaim Surfactant Plus oszlopokon, Thermo Scientific, Waltham, Egyesült Államok) 30°C -on valósult meg, míg a jelek UV detektálása 225 nm hullámhosszon történt. A gyártó által ajánlott módszeren kisebb módosításokat (mobil fázis pH-értékének és összetételének megváltoztatása)

hajtottunk végre (THERMO SCIENTIFIC 2013). A mobil fázis áramlási sebessége izokratikus elválasztás mellett 0,6 ml/min volt (25:75 A:B eluensek, A = 100 mM ammónium-acetát vizes oldata (pH = 5,0), B = acetonitril, 8 percen keresztül). Az injektált minta mennyisége 20 µl volt.

A neonikotinoid-típusú hatóanyagok vízmintákban történő meghatározását szintén HPLC-UV technikával végeztük el, amely során a hatóanyagok elválasztása C₁₈-oszlopokon, 40°C-on történt, míg a jelek UV detektálása 252 és 269 nm hullámhosszokon valósult meg. Az eluens áramlási sebessége 1 ml/min volt, izokratikus elúció mellett 10 percen keresztül (70:30 = A:B eluensek, A = 90% víz:10% MeOH, B = MeOH).

A felezési idők meghatározását a meghatározott koncentrációk ábrázolását követően logisztikus (szigmoid) nem lineáris regresszió alkalmazásával határoztuk meg, ahol a görbék inflexiós pontjai megfelelnek a DT₅₀-értékeknek. Az adatok statisztikai kiértékelése általános lineáris modell használatával valósult meg, az R 4.0 statisztikai program (*The R Foundation for Statistical Computing*, Bécs, Ausztria) alkalmazásával. Az adatok normalitását és a varianciák homogenitását minden esetben diagnosztikai ábrákkal (QQ-plot), Shapiro–Wilk- és Levene-tesztek alkalmazásával ellenőriztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK

4.1. Állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények hatásai nagy vízi bolha (*Daphnia magna*) tesztszervezeten

4.1.1. Állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények akut toxicitása *Daphnia magna* immobilizációs vizsgálatokban

A *Daphnia magna* immobilizációs vizsgálatok eredményei alapján a vizsgált állatgyógyászati hatóanyagok közül a *sulfaguanidine* (SGD) bizonyult a legtoxikusabbnak (48h $EC_{50} = 1,5 \pm 0,3$ mg/l), majd a *sulfadiazine* (SDZ) (48h $EC_{50} = 16,2 \pm 3,2$ mg/l) míg a *sulfamethazine* (SMZ) (48h $EC_{50} = 62,2 \pm 23,3$ mg/l), a *sulfamethoxazole* (SMX) (48h $EC_{50} = 82,6 \pm 11,2$ mg/l) és a *trimethoprim* (TRI) (48h $EC_{50} = 99,8 \pm 22,5$ mg/l) hatóanyagok kevésbé toxikusnak bizonyultak.

Az SMX és TRI hatóanyagot tartalmazó készítmények vizsgálata során a SUMETROLIM szignifikánsan toxikusabbnak bizonyult (48h $EC_{50} = 110,9 \pm 30,0$ mg/l) a COTRIM E-ratiopharm (48h $EC_{50} = 1189,4 \pm 275,8$ mg/l) hatásaihoz képest ($p < 0,001$).

Az SMX és TRI hatóanyagok együttes toxicitásának vizsgálata során meghatározott 48h EC_{50} -értékek átlagát és szórását az I. táblázat foglalja össze. A két hatóanyag egyedi toxicitása között nem tapasztaltunk különbséget ($p = 0,772$), azonban a kombinált hatások vizsgálata során a TRI minden esetben toxikusabbnak bizonyult ($p < 0,001$).

I. táblázat A *sulfamethoxazole* (SMX) és *trimethoprim* (TRI) hatóanyagok egyedi és együttes toxicitásának vizsgálata során meghatározott 48h EC_{50} -értékek

48h EC_{50} -értékek (mg/l)*							
egyedi		készítmények**				keverék**	
SMX	TRI	SUMETROLIM SMX ekv.	TRI ekv.	COTRIM E. SMX ekv.	TRI ekv.	SMX ekv.	TRI ekv.
82,6±11,2	99,8±22,5	110,9±30,0		1189,4±275,8		92,8±26,0	
		74,3±20,1	15,0±4,0	82,8±19,2	12,3±2,8	62,2±17,4	12,5±3,5

* Az SMX és TRI hatóanyagok együttes toxicitását a hatóanyagok tiszta keverékének és formázott készítmények formájában is vizsgáltuk.

** A keverék vagy készítmény egyes hatóanyagokra vonatkozóan feltüntetett 48h EC_{50} -értéke az adott hatóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó keverékben vagy készítményben jelen van.

Az *SMX* egyedi toxicitása során meghatározott 48h EC_{50} -értékek és a *TRI* hatóanyaggal együttes hatások vizsgálata során a hatóanyag-keverék és a készítmények *SMX*-tartalomra korrigált 48h EC_{50} -értékei között nem tapasztaltunk eltérést ($p > 0,050$). A *TRI* esetében viszont az egyedi toxicitás mértéke alacsonyabbnak bizonyult a formázott készítményekben és a vizsgált tiszta hatóanyag-keverékben kialakuló együttes kombinált toxikus hatásokhoz képest ($p < 0,001$), azonban a kombinációk esetében meghatározott *TRI*-tartalomra korrigált 48h EC_{50} -értékek között nem figyelhető meg különbség ($p > 0,168$).

A *D. magna* tesztorganizmeneten elvégzett akut tesztek alapján látható, hogy a szulfonamidok csoportjába tartozó hatóanyagok toxicitásában jelentős különbségek figyelhetők meg. A szulfonamidok fizikai, kémiai, farmakológiai, toxikológiai és antibakteriális tulajdonságait elsősorban a közös szerkezeti elemhez kapcsolódó funkciós csoportok és az R-szubsztituens jellege határozza meg (BIALK-BIELINSKA *et al.* 2013, PERJÉSI 2014). Saját eredményeink alapján a szulfonamid nitrogénatomján nem gyűrűs szubsztituenset tartalmazó vegyület, az *SGD* (48h $EC_{50} = 1,5 \pm 0,3$ mg/l) a többi gyűrűs szubsztituenssel rendelkező szulfonamidhoz képest jóval toxikusabbnak bizonyult ($p < 0,050$), ugyanis a legtoxikusabb gyűrűs szubsztituenssel rendelkező *SDZ*-nél (48h $EC_{50} = 16,2 \pm 3,2$ mg/l) is kb. 10-szer nagyobb volt a toxicitása. Az *SGD* esetében meghatározott 48h EC_{50} -érték belesik a De Liguoro és munkatársai (2009, 2010) által közölt átlagos 48h EC_{50} -értékek tartományába (0,87–3,86 mg/l), továbbá a Bialk-Bielinska és szerzőtársai (2013) által összegyűjtött 48h EC_{50} -értékek között is az *SGD* bizonyult a legtoxikusabb szulfonamid-típusú hatóanyagnak *D. magna* tesztorganizmeneten. Az *SDZ* esetében meghatározott toxicitási érték (48h $EC_{50} = 16,2 \pm 3,2$ mg/l) jóval alacsonyabb a korábban közölt átlagos 48h EC_{50} -értékeknél (48h $EC_{50} = 212$ – 221 mg/l) (WOLLENBERGER *et al.* 2000, DE LIGUORO *et al.* 2009). Az értékek között tapasztalható jelentős szórás hátterében feltételezhetően az eltérő pH-érték állhat, ugyanis több tanulmányban igazolták az *SDZ* toxicitásának növekedését a pH-érték csökkenésével (ANSKJAER *et al.* 2013, LIU *et al.* 2016). Az általunk meghatározott toxicitásértékek az *SMZ* és *SMX* esetében jóval alacsonyabbak a szakirodalomban megtalálható értékeknél (175–216 mg/l és 189–316 mg/l) (KIM *et al.* 2007, PARK és CHOI 2008, DE LIGUORO *et al.* 2009). A *TRI* esetében meghatározott 48h EC_{50} -értékek ezzel szemben összhangban vannak az irodalmi adatokkal (100–167 mg/l) (FERRARI *et al.* 2004, KOLAR *et al.* 2014, MENDEL *et al.* 2015). A szakirodalmi adatok alapján a *TRI* egyedi toxicitása meghaladja az *SMX* önálló toxicitását.

A vizsgált készítmények toxicitásában közel tízszeres különbség figyelhető meg, ezt részben magyarázza, hogy a készítmények hatóanyag-tartalmában azonos tömegre vonatkoztatva kb. hatszoros különbség figyelhető meg (SUMETROLIM: 400 mg *SMX* + 80 mg *TRI*/ 600 mg

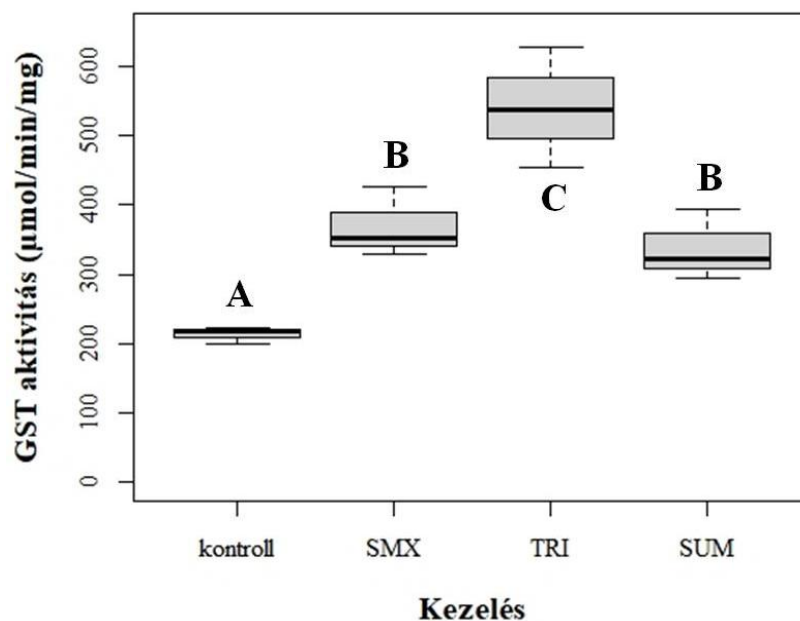
készítmény; COTRIM E-ratiopharm: 65,5 mg *SMX* + 13,1 mg *TRI*/ 600 mg készítmény). Az adalékanyagok összetételében is különbségek figyelhetők meg a különböző formulációk (tabletta, szuszpenzió) esetében, amelyek szintén befolyásolják a készítmények toxicitását (3. melléklet I. táblázat). A SUMETROLIM és COTRIM E-ratiopharm *D. magna* szervezetre gyakorolt akut hatásait vizsgáló tanulmány munkámat megelőzően nem állt rendelkezésre.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a *TRI* és az *SMX* hatóanyagok között szinergens hatás figyelhető meg a vizsgált készítmények összetételében feltüntetett ekvivalens koncentrációk vizsgálata során, amely hatás mértékét a készítmények formázása során felhasznált adalékanyagok nem befolyásolták (I. táblázat). A szulfonamidok és a *TRI* között fellépő szinergizmus már bizonyított a különböző antibiotikus hatású készítmények esetében, így számos humán- és állatgyógyászati készítményben alkalmazzák kombinációikat (ZINNER és MAYER 2015). A különböző kombinációk hatásait több tanulmányban vizsgálták *D. magna* tesztszervezeten (pl. *SMZ* + *TRI*) (DE LIGUORO *et al.* 2009, 2010). Az *SMX* + *TRI* hatóanyagok együttes hatásainak vizsgálata során egy Mendel és munkatársai (2015) által bemutatott poszter összefoglalójában megtalálható eredmények alapján az *SMX* és *TRI* hatóanyagok toxicitása között nem volt megfigyelhető interakció a vizsgált koncentrációtartományban, azonban esetükben is a *TRI* volt a toxikusabb hatású komponens.

4.1.2. A sulfamethoxazole és trimethoprim állatgyógyászati hatóanyagok és formázott készítményük enzimaktivitásra gyakorolt hatásai *Daphnia magna* juvenilekben

A glutation-S-transzferáz (GST) enzim aktivitására gyakorolt hatások vizsgálata során látható, hogy az *SMX* és *TRI* hatóanyagok akut tesztekben meghatározott 48h EC₂₀-értéknek megfelelő koncentrációban (30 mg/l) történő egyedi expozíciója mindkét esetben az enzimaktivitás növekedését eredményezte (*SMX*: 369,3±50,2 µmol/min/mg (p = 0,039), *TRI*: 541±87 µmol/min/mg (p < 0,001) a kontrollcsoportban mért értékhez képest (212,8±12,4 µmol/min/mg) (9. ábra). A két hatóanyag egyedi akut toxicitásában nem volt megfigyelhető különbség (I. táblázat), azonban az enzimvizsgálatok esetében a *TRI* a GST detoxifikációs enzim magasabb szintű indukcióját idézte elő az *SMX*-hez képest. (p = 0,025).

A SUMETROLIM nagyságrendileg azonos koncentrációban (35 mg/l) történő alkalmazása szintén szignifikáns mértékben megemelte a GST szintjét (337,0±51,4 µmol/min/mg (p = 0,028) a kontrollcsoporthoz képest. A készítmény és az *SMX* hatásai között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (p = 0,090), azonban a *TRI* jelentős mértékben megemelte a GST aktivitását a készítményhez képest is (p = 0,010) (9. ábra). Eredményeink alapján a GST-aktivitás az immobilizációhoz képest jóval érzékenyebb végpontnak bizonyult.



9. ábra A sulfamethoxazole (SMX) és trimethoprim (TRI) hatóanyagok, valamint formázott készítményük a SUMETROLIM (SUM) hatása a glutation-S-transzferáz (GST) aktivitására

A GST elsősorban a hepatotoxikus vegyületek biotranszformációjában (detoxifikációs folyamatokban) játszik fontos szerepet, azonban kisebb mértékben más xenobiotikumok szervezetbe jutása is hatással van aktivitásának mértékére (PFLUGMACHER *et al.* 1998), így jól alkalmazható biomarkere a xenobiotikumok által előidézett detoxifikációs folyamatok indukciójának. Habár az emlősökhöz képest a vizsgált testszervezet detoxifikáló rendszere nem olyan összetett és diverz elsősorban a szubsztrátok tekintetében, a vízi bolhák esetében is megfigyelhető a szubsztrátspecifikus GST-aktivitás (LEBLANC és COCHRANE 1985).

A GST aktivitását, mint végpontot, számos tanulmányban alkalmazták a különböző xenobiotikumok *D. magna*-ra gyakorolt hatásainak vizsgálta során (QI *et al.* 2013, SONG *et al.* 2017). Bár az SMX és a TRI *D. magna* GST-aktivitására gyakorolt hatásainak vizsgálatát célzó tanulmányokat nem találtam a szakirodalomban, vélelmezhető, hogy itt is a xenobiotikum hatására fokozódó metabolikus aktivitás részeként indukálódik a termelődése, hiszen a GST enzimek (citoszolikus, mikroszomális vagy mitokondriális alakban egyaránt) hidrofób és elektrofil idegen molekulák széles skálájához képesek a glutationt konjugálni, ezzel inaktiválni és a szervezetből kiválasztani (HAYES *et al.* 2005), így több tanulmányban már alacsonyabb vizsgálati koncentrációk esetében is igazolták a GST aktivitásának szignifikáns növekedését SMX-kezelés hatására pl. hal (0,02–2 mg/l) és alga testszervezeteken (2–2,5 mg/l) (LI *et al.* 2012, LU *et al.* 2013, NIE *et al.* 2013), míg magasabb SMX-koncentrációknál (2–10 mg) hal testszervezeten a GST-aktivitás csökkenését tapasztalták (LI *et al.* 2012). A TRI esetében vándorkagylók (*Dreissena polymorpha*) 96-órás *in vivo* expozícióját követően a vizsgált

koncentrációkban (1–3 nM) szintén a GST-aktivitás szignifikáns növekedését tapasztalták (BINELLI *et al.* 2009). A szulfonamidok csoportjába tartozó *sulfathiazole* esetében egy tanulmányban a GST szignifikáns növekedését figyelték meg már 9,5 mg/l koncentrációnál *D. magna* testszervezetben (KIM *et al.* 2009).

A szakirodalmi adatok és saját eredményeink alapján megállapítható, hogy a II. fázis detoxifikáló enzimeit közé tartozó GST aktivitásának emelkedése már igen kis koncentrációk esetében is megfigyelhető a különböző vízi szervezetek esetében, amely elsősorban azt jelzi, hogy a vizsgálati anyagok alapvetően ezen enzimek közreműködésével konjugálódnak. Az igen poláros vegyületek közé tartozó hatóanyagok (*SMX* $\log K_{ow} = 0,89$, *TRI* $\log K_{ow} = 0,91$) (HANSCH *et al.* 1995, KIM *et al.* 2007) közvetlen glutationnal történő konjugációja könnyen megvalósul a GST katalizált folyamat során, ezzel elősegítve eliminációjukat a szervezetből.

4.2. A neonikotinoid-készítményekben alkalmazott hatóanyagok és adalékanyagok egyedi és kombinált toxikus hatásai

4.2.1. A vizsgált neonikotinoid-típusú készítmények és összetevőinek akut toxicitása

Daphnia magna immobilizációs vizsgálatokban

A *D. magna* immobilizációs vizsgálatok eredményei alapján a vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyagok közül a *thiacloprid* (*TCL*) bizonyult a legtoxikusabbnak (48h $EC_{50} = 10,4 \pm 3,7$), amelyet a *thiametoxam* (*TMX*) (48h $EC_{50} = 126,0 \pm 33,1$ mg/l) követett a toxicitási sorrendben, ezzel szemben a *clothianidin* (*CLO*) és az *acetamiprid* (*ACE*) esetében igen alacsony toxicitást tapasztaltunk. A *CLO*-t vízoldhatóságának határán (340 mg/l) (MACBEAN 2012) vizsgálva csak 38%-os mozgásképtelenségét tapasztaltunk, míg az *ACE* 200 mg/l-es koncentrációnál az egyedek 10%-a vált mozgásképtelenné.

A készítmények értékelése során ugyanakkor a *CLO*-t tartalmazó APACHE 50 WG volt a legtoxikusabb (48h $EC_{50} = 26,6 \pm 8,7$ mg/l). A CALYPSO 480 SC (48h $EC_{50} = 61,1 \pm 19,6$ mg/l) és a MOSPILAN 20 SG (48h $EC_{50} = 254,9 \pm 51,9$ mg/l) készítményeket követően, az ACTARA 240 SC (48h $EC_{50} = 1094,6 \pm 303,7$ mg/l) volt a legkevésbé toxikus.

A vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyagok egyedi és a formázott készítmények előállításánál alkalmazott adalékanyagokkal együttes toxicitásának összehasonlítása során meghatározott 48h EC_{50} -értékek átlagát és szórását a II. táblázat foglalja össze. Az összehasonlító vizsgálatok során a *CLO* és az *ACE* egyedi toxicitásához képest a hatóanyagok formázó anyagokkal együttes toxicitása jóval magasabb volt. A *CLO*-tartalmú készítményben az összetevők kombinált toxicitása kevesebb, mint 1/25 része a hatóanyag egyedi toxicitásának. Az

ACE 200 mg/l koncentrációban csak 10%-os mozgásképtelenséget eredményezett a kezelt egyedek esetében, ezzel szemben az adalékanyagok jelenlétében meghatározott 48h EC_{50} érték $51,5 \pm 10,5$ mg/l volt. A *TMX* egyedi toxicitásához képest, ezzel szemben alacsonyabb volt a hatóanyagok és a készítményeikben megtalálható adalékanyagok együttes toxicitása ($p = 0,002$). A *TCL* esetében nem volt igazolható statisztikai különbség a hatóanyag egyedi és az adalékanyagok együttes toxicitása között ($p = 0,556$) (II. táblázat).

II. táblázat A vizsgált hatóanyagok egyedi és formázott készítményeikben megtalálható adalékanyagokkal együttes toxicitásának vizsgálata során meghatározott 48h EC_{50} -értékek

Vizsgált hatóanyagok	48h EC_{50} -értékek (mg/l)*		
	egyedi átlag $\pm$ SD	Vizsgált készítmények	készítményben átlag $\pm$ SD
<i>thiacloprid</i>	10,4 $\pm$ 3,7	CALYPSO 480 SC (<i>TCL</i>)	24,7 $\pm$ 7,9
<i>thiametoxam</i>	126,0 $\pm$ 33,1	ACTARA 240 SC (<i>TMX</i>)	236,4 $\pm$ 65,6
<i>clothianidin</i>	> 340	APACHE 50 WG (<i>CLO</i>)	13,3 $\pm$ 4,4
<i>acetamiprid</i>	> 200	MOSPILAN 20 SG (<i>ACE</i>)	51,5 $\pm$ 10,5

* A készítményekre vonatkozóan feltüntetett 48h EC_{50} -értéke az adott hatóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó készítményben jelen van.

A MOSPILAN 20 SG készítményben megtalálható ható- és formázóanyag (lineáris alkil-benzol-szulfonátok, *LAS*) egyedi toxicitásának meghatározása mellett, együttes toxicitásukat tiszta (a rovarirtószer-készítményekben található egyéb összetevőktől mentes) keverék formájában is vizsgáltuk, a készítményben feltüntetett arányuknak megfelelően. Az összetevők egyedi és kombinált toxicitásának vizsgálata során meghatározott 48h EC_{50} -értékek átlagát és szórását a III. táblázat foglalja össze.

A *LAS* magas egyedi toxicitását (48h $EC_{50} = 13,0 \pm 3,3$ mg/l) tapasztaltuk a vizsgált hatóanyag önálló toxicitásához képest. Az *ACE*-tartalomra korrigált 48h EC_{50} -értékek alapján megállapítható, hogy az *ACE* egyedi toxicitásához képest, *LAS* jelenlétében a kombinált hatások emelkedése volt megfigyelhető tiszta keverék és a készítmény formájában is. A *LAS* esetében ugyanez a tendencia figyelhető meg ($p < 0,009$), tehát a vizsgált anyagok egyedi és kombinált toxicitásának sorrendje mindkét vizsgált komponens esetében a következőképpen alakult: egyedi toxicitás < készítmény < tiszta keverék. A legerősebb szinergens hatást a vizsgált anyagok tiszta keverékének vizsgálata során tapasztaltuk, ugyanis a keverék esetében meghatározott 48h EC_{50} -értékek igen jelentős mértékben lecsökkentek a készítmény esetében meghatározott toxicitásértékekhez képest is (*ACE*: $p < 0,001$, *LAS*: $p = 0,008$) (III. táblázat).

III. táblázat Az *acetamiprid* (ACE) és a lineáris alkil-benzol-szulfonátok (LAS) egyedi és kombinált toxicitásának vizsgálata során meghatározott 48h EC₅₀-értékek

48h EC ₅₀ -értékek (mg/l) *					
egyedi		készítmény** MOSPILAN 20 SG		keverék**	
ACE	LAS	ACE ekv.	LAS ekv.	ACE ekv.	LAS ekv.
> 200	13,0±3,3	254,9±51,9		11,0±3,9	
		51,5±10,5	6,1±1,2	2,2±0,8	0,3±0,1

* A vizsgált ható- és formázóanyag együttes toxicitását tiszta keverékük és formázott készítmény formájában is vizsgáltuk.

** A keverék vagy készítmény, ható- vagy formázóanyagra vonatkozóan feltüntetett 48h EC₅₀-értéke az adott ható-, vagy formázóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó keverékben vagy készítményben jelen van.

A neonikotinoid-típusú vegyületek a közös szerkezeti tulajdonságok ellenére igen különböző molekuláris tulajdonságokat mutatnak, mely szerkezeti változatosság többek között a molekulatömegben, vízdoldhatóságban és lipofilitásban is megmutatkozik (TOMIZAWA és CASIDA 2005, MORRISSEY *et al.* 2015), így nem meglepő a hasonló szerkezetű anyagcsoporton belül tapasztalt toxicitásértékek magas variabilitása. Korábbi vizsgálatok alapján a *D. magna* tesztorganizmus kevésbé bizonyult érzékenynek a neonikotinoidok hatásaival szemben (BEKETOV és LIESS 2008, RABY *et al.* 2018). Az általunk vizsgált hatóanyagok egyedi toxicitásának vizsgálata során a *TCL* bizonyult a legtoxikusabbnak (48h EC₅₀ = 10,4±3,7 mg/l), amely érték jóval alacsonyabb a szakirodalomban közölt akut toxicitási értékekhez képest: 48h EC₅₀ > 85 mg/l (SCHMUCK 2001, FAO 2010, LOUREIRO *et al.* 2010). Az általunk meghatározott 48h EC₅₀-értékek (126,0±33,1 mg/l) a *TMX* esetében összhangban állnak a korábbi tanulmányokban közölt értékekkel (> 80 mg/l) (ANDERSON *et al.* 2015, FINNEGAN *et al.* 2017, RABY *et al.* 2018). A *CLO* a *TMX* inszekticid hatású bomlásterméke, amely a *TMX* oxadiazingyűrűjének hasadása révén jön létre (SIMON-DELISO *et al.* 2015). Eredményeink alapján a kialakuló metabolit jóval kevésbé toxikus a *D. magna* tesztorganizmusra, ugyanis a *CLO*-kezelés hatására a vízdoldhatóság határán (340 mg/l) csak 38%-os mozgásképtelenségét tapasztaltunk, ezzel szemben a szakirodalomban publikált adatok magasabb toxicitást jeleznek [67,6 µg/l (HAYASAKA *et al.* 2013) és 40–119 mg/l (US EPA 2003, HAITH 2010, ANDERSON *et al.* 2015)]. Az *ACE* esetében vizsgált legmagasabb koncentráció 10%-os mozgásképtelenséget idézett elő. A vizsgálatokat nem végeztük el magasabb koncentrációkon, mivel környezetileg már a 200 mg/l sem tekinthető relevánsnak, hiszen a felszíni vizekben detektált *ACE*-koncentráció (0,003–44 µg/l) nagyságrendekkel az általunk vizsgált maximális koncentráció alatt helyezkedik el (MORRISSEY *et al.* 2015, STRUGER *et al.* 2017, MAHAI *et*

al. 2019). Az ACE esetében kapott alacsony mértékű toxicitás megfelel a Yamada és munkatársai (1999) által meghatározott toxicitási szintnek (48h EC₅₀-érték > 1000 mg/l), ezzel szemben számos tanulmányban jóval magasabb toxicitást (49,2–50,7 mg/l) igazoltak (EUROPEAN COMMISSION 2004, ASHAUER *et al.* 2011, WU *et al.* 2011b).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a neonikotinoid-tartalmú készítményekben a hatóanyagok és a formázóanyagok együttes hatása meghaladhatja (ACE és CLO) az aktív hatóanyag egyedi toxicitását vagy alul maradhat (TMX) ahhoz képest a kisserelt készítményben (II. táblázat). Jemec és munkatársai (2007) vizsgálataik során további neonikotinoid-típusú hatóanyag [imidacloprid (IMI)] és formázott készítményének (CONFIDOR SL 200) *D. magna*-ra gyakorolt hatásait hasonlították össze. Vizsgálataikban szintén a hatóanyag egyedi toxicitásához képest magasabb toxicitást figyeltek meg készítmény esetében, de más hatóanyagok és tesztorganizmusok esetén is igazolták a készítmény fokozott toxicitását a hatóanyag egyedi toxicitásához képest (TSUI és CHU 2003, MESNAGE *et al.* 2014).

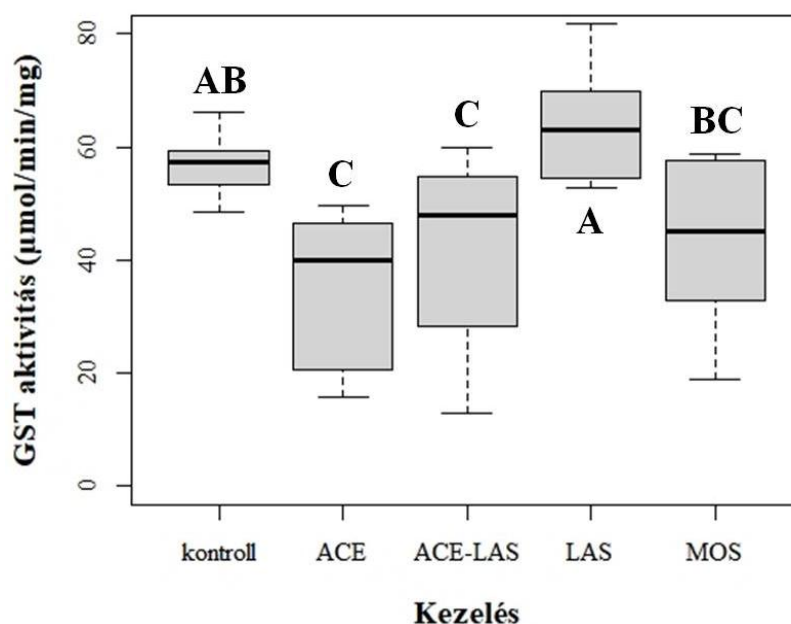
Az ACE és a LAS egyedi, valamint kombinált együttes hatásainak vizsgálata során a vizsgált formázóanyag egyedi toxicitása (48h EC₅₀ = 13,0±3,3 mg/l) meghaladta a vizsgált hatóanyag toxicitását (III. táblázat). Az adalékanyagok esetében tapasztalt magas egyedi toxicitást már több tanulmányban is igazolták *D. magna* tesztorganizmuson is (BRAUSCH *et al.* 2007, SOBRINO-FIGUEROA 2018). A LAS általunk meghatározott toxicitása nagyságrendileg megközelíti a szakirodalomban megtalálható átlagos toxicitásértékeket (48h EC₅₀ = 3,7–10,1) (JURADO *et al.* 2011, SOBRINO-FIGUEROA 2018). A LAS toxicitása *D. magna* tesztorganizmuson nagymértékben függ az alkilcsoport hosszától és a molekulatömegétől (VERGE *et al.* 2001), továbbá a juvenilek tenyésztése és tesztelése során alkalmazott vizes közeg keménységétől (MAKI és BISHOP 1979). Az ACE és LAS MOSPILAN 20 SG összetételében feltüntetett koncentrációkkal ekvivalens mennyiségben történő tiszta keverék formájában történő együttes vizsgálata során erős szinergens hatás volt megfigyelhető, az együttes toxicitás mértékét a készítményben megtalálható további adalékanyagok (74%-a a készítménynek, de nem ismert a pontos összetételük) azonban szignifikáns mértékben lecsökkentették (ACE: $p < 0,001$, LAS: $p = 0,008$) (III. táblázat).

4.2.2. Az acetamidid és a lineáris-alkil-benzolszulfonátok (LAS) enzimaktivitásra gyakorolt egyedi és kombinált hatásai *Daphnia magna* juvenilekben

Az enzimaktivitás-vizsgálatokban alkalmazott koncentrációk (az akut vizsgálatokban meghatározott 48h EC₂₀-értéknek megfelelő koncentrációk) egyik kezelés esetében sem okozták a kezelt egyedek mozgásképtelenségét/pusztulását, tehát a biokémiai eredmények szubletális

dózisnak megfelelő változásokat tükröznek. A vizsgált ható- és formázóanyagok együttes toxicitását tiszta keverékük (*ACE-LAS*) és formázott készítményük a MOSPILAN 20 SG formájában vizsgáltuk. Az *ACE* és *LAS* keverékének elkészítése során alkalmazott koncentrációk megfeleltek a MOSPILAN 20 SG készítményben feltüntetett ható- és formázóanyag-összetételnek.

A GST-aktivitásra gyakorolt hatások vizsgálata során látható, hogy az *ACE* esetében meghatározott 48h EC₂₀-értéknek megfelelő koncentrációban történő expozíció (65 mg/l) során meghatározott enzimaktivitás ($34,7 \pm 13,3$ $\mu\text{mol/min/mg}$) szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,001$) a kontrollcsoportban megfigyelhető enzimaktivitásnál ($56,5 \pm 4,9$ $\mu\text{mol/min/mg}$) (10. ábra).



10. ábra Az *acetamiprid* (*ACE*) és a lineáris alkil-benzol-szulfonátok (*LAS*), valamint formázott készítményük a MOSPILAN 20 SG (*MOS*) és tiszta keverékük (*ACE-LAS*) hatása a glutation-S-transzferáz (GST) aktivitására

A kombinált hatások vizsgálata során az átlagos enzimaktivitás csökkenése volt megfigyelhető az *ACE* és a *LAS* tiszta keverékének (7,4 mg/l *ACE*; 0,9 mg/l *LAS*) és a formázott készítmény (15,6 mg/l *ACE*; 1,9 mg *LAS*) esetében is, azonban a csökkenés csak a tiszta keverék esetében volt szignifikáns mértékű ($p = 0,028$) a kontrollcsoporthoz képest. A vizsgált összetevők kombinált hatása között szignifikáns különbség nem mutatkozott ($p = 0,990$). A vizsgált ható- és formázóanyag együttes toxicitása nem különbözött szignifikáns mértékben a hatóanyag egyedi toxicitástól a keverék ($p = 0,860$) és a készítmény ($p = 0,710$) esetében sem. A *LAS* egyedi expozíciója (3,8 mg/l) az átlagos enzimaktivitás kismértékű emelkedését ($64,2 \pm 10,5$ $\mu\text{mol/min/mg}$) idézte elő, azonban a változás statisztikailag nem szignifikáns ($p = 0,590$) a kontrollhoz képest, ezzel szemben szignifikánsan magasabb volt az *ACE* egyedi ($p < 0,001$) és a

vizsgált összetevők tiszta keverékének ($40,5 \pm 18,2 \mu\text{mol/min/mg}$, $p < 0,001$), valamint formázott készítményének ($43,0 \pm 16,1 \mu\text{mol/min/mg}$, $p = 0,018$) expozíciója esetében tapasztalt enzimaktivitási szintnél (10. ábra).

Az akut tesztekben meghatározott 48h EC_{20} -értékek esetében meghatározott enzimaktivitási értékek alapján az ACE fokozott toxicitása volt megfigyelhető, ugyanis a vizsgált hatóanyag-koncentráció (65 mg/l) az enzimaktivitás szignifikáns mértékű csökkenését, vagyis a GST enzim működésének gátlását eredményezte, az akut immobilizációs tesztek eredményeivel szemben, ahol a legtöményebb dózis (200 mg/l) is csak 10%-os mozgásképtelenséget eredményezett a vizsgált egyedeken. Munkánkat megelőzően az ACE GST aktivitására gyakorolt hatásait vizsgáló tanulmány *D. magna* testszervezetre vonatkozóan nem állt rendelkezésre a szakirodalomban. *D. magna* szervezeten más neonikotinoid-típusú (IMI – 2,5 mg/l), és egyéb növényvédőszer-hatóanyagok (*chlorpyrifos* – 2,8 $\mu\text{g/l}$; *trifluralin* – 0,66 mg/l) esetében a kezdeti GST-szint emelkedését követően, szintén a GST enzim működésének gátlását tapasztalták a magasabb vizsgált koncentrációkon (JEMEC *et al.* 2007, SONG *et al.* 2017). A GST aktivitásának csökkenése feltehetően a reaktív oxigénvegyületek termelődésével magyarázható, a xenobiotikumok által előidézett oxidatív stressz következményeként. Ezek a keletkező reaktív vegyületek szignifikáns mértékben késleltetik vagy gátolják a szubsztrát oxidációját. Az enzimműködés befolyásolásának közvetett módja lehet a növényvédő szerek metabolizmusa során keletkező reaktív oxigénvegyületekhez történő kötődés is (SUR és STORK 2003).

A LAS akut immobilizációs tesztekben tapasztalt magas toxicitása nem volt tapasztalható az enzimaktivitás-vizsgálatok esetében beállított koncentráció esetében (3,8 mg/l). McLoughlin és munkatársai (2000) a LAS GST-aktivitásra gyakorolt hatásait egy szintén vízi *Crustacea*-fajon (*Gammarus pulex*) vizsgálták, ám eredményeik alapján ők sem bizonyították a LAS GST-aktivitásra gyakorolt hatását.

Az ACE minden vizsgált koncentrációban és vizsgálati beállítás esetében (egyedi toxicitás, LAS formázóanyaggal együttes toxicitás a tiszta keverék és készítmény formájában) a GST-enzimaktivitás csökkenését idézte elő. A LAS egyedi toxicitásának (3,8 mg/l) vizsgálata során nem tapasztaltunk eltérést a kontrollcsoporthoz képest, így a tiszta keverék expozíciója során a MOSPILAN 20 SG összetételében feltüntetett ACE:LAS-aránynak megfelelő kisebb LAS-koncentráció (0,9 mg/l) esetében sem várnánk hatást a kontrollhoz képest, ezzel szemben a készítményben feltüntetett hatóanyag-tartalommal ekvivalens mennyiségű ACE (7,4 mg/l) jelenlétében gátló hatás figyelhető meg a GST aktivitásában (10. ábra). A szakirodalmi adatok és saját eredményeink alapján megállapítható, hogy a vizsgált szulfonamid-típusú állatgyógyászati

hatóanyagokhoz hasonlóan a neonikotinoidok esetében is tapasztalható GST-aktivitásváltozás a vizsgált vízi szervezet esetében.

4.3. Glyphosate hatóanyag-tartalmú készítmények összetevőinek egyedi és kombinált toxicitása vízi testszervezeteken

4.3.1. A vizsgált glyphosate-tartalmú készítmények és összetevőinek akut toxicitása *Daphnia magna* immobilizációs vizsgálatokban

A glyphosate (GLY)– tartalmú ROUNDUP CLASSIC és MEDALLON PREMIUM és összetevőinek egyedi és kombinált toxicitásának vizsgálta során meghatározott 48h EC₅₀-értékeket a IV. és V. táblázatok foglalják össze. A vizsgálatokat elvégeztük saját laboratóriumi tenyészetünkön és a kereskedelmi forgalomban kapható Daphtoxkit F tesztcsomag (MicroBioTest, Gent, Belgium) által biztosított *Daphnia*-egyedeken is. A GLY esetében meghatározott 48h EC₅₀-értékek 633,3±156,0 mg/l (labortörzs) és 409,1±32,7 mg/l (Daphtoxkit). A készítmények összetevőinek vizsgálata során a legnagyobb mértékű toxicitást a formázóanyagok esetében tapasztaltuk: POEA (polietoxilált faggyúaminok keveréke): 4,5±0,5 mg/l (labortörzs) és 4,8±0,7 mg/l (Daphtoxkit); APG (alkil-poliglükózid): 20,8±5,5 mg/l (labortörzs) és 25,4±5,1 mg/l (Daphtoxkit) (p < 0,001). A készítmények toxicitása között is jelentős eltérést tapasztaltunk, ugyanis a ROUNDUP CLASSIC esetében tapasztalt toxicitás mértéke [48h EC₅₀ = 25,8±4,6 mg/l (labortörzs) és 59,0±7,1 mg/l (Daphtoxkit)] jelentős mértékben meghaladta a MEDALLON PREMIUM esetében meghatározott akut toxicitást [48h EC₅₀ = 553,0±43,3 mg/l (labortörzs) és 285,8±45,7 mg/l (Daphtoxkit)] (p < 0,001).

IV. táblázat A ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek vizsgálata során meghatározott 48h EC₅₀-értékek a laboratóriumi *D. magna*-tenyészet és a Daphtoxkit tesztcsomag esetében

Vizsgált törzs	48h EC ₅₀ -értékek (mg/l) *					
	egyedi		ROUNDUP CLASSIC **		keverék **	
	GLY	POEA	GLY ekv.	POEA ekv.	GLY ekv.	POEA ekv.
labortörzs	633,3±156,0	4,5±0,5	25,8±4,6 10,7±1,9	4,0±0,7	21,1±7,0 13,1±4,3	3,3±1,1
Daphtoxkit	409,1±32,7	4,8±0,7	59,0±7,1 24,5±4,4	9,1±1,1	-	-

* A vizsgált ható- (GLY) és formázóanyag (POEA) együttes toxicitását tiszta keverékük és formázott készítmény formájában is vizsgáltuk.

** A keverék vagy készítmény, ható- vagy formázóanyagra vonatkozóan feltüntetett 48h EC₅₀-értéke az adott ható-, vagy formázóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó keverékben vagy készítményben jelen van.

A ROUNDUP CLASSIC készítmény hatóanyag-tartalomra korrigált toxicitása magasabb volt a hatóanyag egyedi toxicitásához képest mindkét törzs esetében ($p < 0,001$). A formázott készítmény és a tiszta keverék esetében meghatározott, GLY-tartalomra korrigált 48h EC₅₀-értékek között nem volt megfigyelhető különbség a labortörzs esetében ($p = 0,289$). A labortenyészet esetében a POEA egyedi toxicitásában és az együttes hatások vizsgálata során meghatározott korrigált 48h EC₅₀-értékekben nem tapasztaltunk különbséget ($p > 0,073$), ezzel szemben a tesztsomag esetében a POEA egyedi toxicitása magasabbnak bizonyult a készítmény esetében meghatározott korrigált érték alapján ($p = 0,005$) (IV. táblázat).

V. táblázat A MEDALLON PREMIUM és összetevőinek vizsgálata során meghatározott 48h EC₅₀-értékek a laboratóriumi *D. magna*-tenyészet és a Daphtoxkit tesztsomag esetében

Vizsgált törzs	48h EC ₅₀ -értékek (mg/l)*			
	GLY	MEDALLON PREMIUM**		APG
		GLY ekv.	APG ekv.	
labortörzs	633,3±156,0	553,0±43,3 188±14,7	82,9±6,5	20,8±5,5
Daphtoxkit	409,1±32,7	285,8±45,7 97,2±15,6	42,9±6,9	25,4±5,1

* A vizsgált ható- (GLY) és formázóanyag (APG) együttes toxicitását készítmény formájában vizsgáltuk.

** A készítmény, ható- vagy formázóanyagra vonatkozóan feltüntetett 48h EC₅₀-értéke az adott ható-vagy formázóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó készítményben jelen van.

A MEDALLON PREMIUM esetében a készítmény hatóanyag-tartalomra korrigált toxicitása szintén meghaladta a hatóanyag egyedi toxicitásának mértékét mindkét populáció esetében ($p < 0,001$) (V. táblázat). A POEA hatásaihoz képest az APG-típusú formázóanyag kevésbé toxikusnak bizonyult a vizsgált tenyészetek esetében (labortörzs: $p = 0,001$; Daphtoxkit: $p = 0,002$) (IV. és V. táblázat). Az APG egyedi toxicitása szignifikánsan magasabb, a GLY egyedi ($p < 0,001$) és a készítmény formázóanyag-tartalomra korrigált toxicitásánál (labortörzs: $p < 0,001$; Daphtoxkit: $p = 0,024$) mindkét populáció esetén (V. táblázat).

A nagy vízíbolha nőtény egyedei nem megfelelő környezeti körülmények között (pl. táplálékhiány, alacsony hőmérséklet) haploid génkészletű, ún. tartós petéket (*ephippium*) képeznek, amelyek a megtermékenyítést követően nyugalmi állapotba kerülnek addig, amíg a környezeti feltételek újra megfelelőek lesznek. A tartós peték egy részéből hímek is fejlődhetnek, amely lehetőséget kínál a váltivarú szaporodásra. Az eltérő genetikai állománnyal

rendelkező utódok megjelenése lehetővé teszi a megváltozott környezeti tényezőkhez történő jobb alkalmazkodást (SCOURFIELD és HARDING 1958, VANOVERBEKE *et al.* 2007, CHOI *et al.* 2016). A tesztcsomag által biztosított tartós petékből, így hím egyedek is kikelhettek, ráadásul ismeretlen arányban, amely befolyásolhatja a populáció érzékenységét, mivel a két nem xenobiotikumokra való érzékenysége eltérő egymástól (IKUNO *et al.* 2008), ezért a laboratóriumi törzs és a Daphtoxkit által biztosított egyedek esetében meghatározott toxicitásértékek közvetlen összehasonlítása nem végezhető el esetünkben.

A GLY ökotoxikológiai tesztelése során igen jelentős különbségek figyelhetők meg a *D. magna* tesztszervezet esetében, ugyanis a szakirodalomban elérhető akut toxicitásértékek a 4,2–24 mg/l (FAO 2001, SIHTMAE *et al.* 2013) nagyságrendtől elérhetik akár a 146–930 mg/l toxicitási tartományt is (MCALLISTER és FORBIS 1978, FORBIS és BOUDREAU 1981, DOMINGUEZ-CORTINAS *et al.* 2008, EGEIS 2020). A feltüntetett toxicitási értékek alapján az általunk meghatározott 48h EC₅₀-értékek nem tekinthetők kiugrónak.

A GLY-tartalmú készítmények toxicitását több tanulmányban is vizsgálták, azonban a meghatározott toxicitási értékek esetében a hatóanyaghoz hasonlóan itt is jelentős mértékűek a szórások, így az elérhető toxicitásértékek igen tág tartományban mozognak (1,75–782 mg/l) (ALBERDI *et al.* 1996, MELNICHUK *et al.* 2007, DOMINGUEZ-CORTINAS *et al.* 2008, PEREIRA *et al.* 2009). A ROUNDUP CLASSIC esetében meghatározott toxicitási értékek (GLY-tartalomra korrigált 48h EC₅₀-értékek: 10,7±1,9 mg/l és 24,5±4,4 mg/l) jól korrelálnak a ROUNDUP készítmények esetében meghatározott 48h EC₅₀-értékekkel (GIESY *et al.* 2000, TU és RANDALL 2001, US EPA 2008, SIHTMAE *et al.* 2013, CUHRA *et al.* 2013). A készítmények esetében meghatározott különbségek az eltérő hatóanyag-tartalommal és a különböző adalékanyagok jelenlétével magyarázhatók. A vizsgált készítmények esetében a biztonsági adatlapokon feltüntetett toxicitási értékek *D. magna* tesztszervezetre vonatkozóan: 48h EC₅₀-értékek 11 mg/l (ROUNDUP CLASSIC) és 160 mg/l (MEDALLON PREMIUM) (MONSANTO EUROPE S.A. 2015, SYNGENTA 2018), amely értékek összhangban vannak az akut vizsgálataink eredményeivel. A MEDALLON PREMIUM készítmény toxicitását további szakirodalmi értékekkel nem tudtam összehasonlítani a megfelelő adatok hiányában.

A GLY és formázott készítményei esetében tapasztalható jelentős mértékű szórások feltételezhetően a különböző *D. magna*-törzsek érzékenységbeli különbségeivel, valamint az eltérő kísérleti körülményekkel (pl. pH, oldott oxigéntartalom, hőmérséklet) magyarázhatók (FOLMAR *et al.* 1979, BAIRD *et al.* 1991, MENSINK és JANSSEN 1994, DILL *et al.* 2010).

A formázóanyagokon elvégzett immobilizációs tesztjeink alapján a POEA esetében meghatározott 48h EC₅₀-értékek (4,5±0,5 és 4,8±0,7 mg/l) összhangban vannak a Demetrio és munkatársai (2014) által meghatározott 96h EC₅₀-értékkel (3,8 mg/l), azonban jóval magasabbak

a vízibolhafajokon (*D. magna* és *D. pulex*) meghatározott 48h EC₅₀-értékhez képest (0,1–2 mg/l) (BRAUSCH *et al.* 2007, EGEIS 2020). A pH-érték változása jelentős mértékben befolyásolja a POEA toxicitását, így az eltérő pH-értékek is eredményezhetik az értékek variabilitását (SERVIZI *et al.* 1987). Az általunk elvégzett vizsgálatokhoz hasonlóan több tanulmányban is a POEA bizonyult a legtoxikusabb komponensnek (SERVIZI *et al.* 1987, TSUI és CHU 2003, RICO-MARTÍNEZ *et al.* 2012). A szakirodalomban elérhető toxicitási vizsgálatokban az APG esetében már 1,5–10 mg/l koncentrációban detektálták a vizsgált nem ionos felületaktív anyag negatív hatásait a fito- és zooplankton-közösségekre, különösképpen *D. magna* esetében (RIERA és COHEN 2016). Több tanulmányban igazolták az APG-vegyületek fokozódó toxicitását a szénlánc hosszának, vagyis a vegyület hidrofobicitásának növekedésével, többek között *D. magna* szervezeten is (UPPGARD *et al.* 2000, JURADO *et al.* 2012). A meghatározott 48h EC₅₀-értékek, így igen tág tartományban mozognak: 7 mg/l (APG C_{12–14}) – 557 mg/l (APG C₈) (STEBER *et al.* 1995, MADSEN *et al.* 1996, 2001).

Több tanulmányban szintén a formázott készítmények megemelkedett toxicitását figyelték meg a felhasznált adalékanyagok (pl. POEA) jelenlétében *D. magna* tesztorganizmen (TSUI és CHU 2003, DOMINGUEZ-CORTINAS *et al.* 2008, PEREIRA *et al.* 2009, SIHTMAE *et al.* 2013), azonban az ellenkezőjére is akad példa ugyanis Cuhra és munkatársai (2013) éppen alacsonyabb toxicitást figyeltek meg a készítményben jelenlévő adalékanyagok jelenlétében. Eredményeinkhez hasonlóan humán sejtvonalakon a GLY egyedi toxicitásához képest az APG fokozott toxicitásáról számoltak be egyedileg és kiszerelt készítmény (MEDALLON PREMIUM) formájában vizsgálva egyaránt (DEFARGE *et al.* 2016).

4.3.2. Fitotoxikus hatások algaszaporodás-gátlási vizsgálatokban és a fotoszintetikus aktivitás meghatározása során lebegő algafajok esetében

A ROUNDUP CLASSIC készítmény vizsgálata során az optikai denzitás (OD) mérések alapján meghatározott 72h EC₅₀-értékek a hatóanyag esetében a *Pseudokirchneriella subcapitata* és a *Desmodesmus subspicatus* algafajok esetében nem különböztek egymástól (*P. subcapitata*: 125,2±16,5 mg/l, *D. subspicatus*: 132,9±2,3 mg/l) ($p = 0,467$). A *Scenedesmus obtusiusculus* esetében ezzel szemben jóval nagyobb egyedi toxicitást tapasztaltunk (73,1±21,2 mg/l) a két másik zöldalgafaj esetében meghatározott egyedi toxicitási értékekhez képest ($p < 0,001$). A POEA egyedi toxicitása szignifikánsan meghaladta a hatóanyag egyedi toxicitását mindhárom algafaj esetében ($p < 0,001$), továbbá a GLY egyedi toxicitásához képest a formázott készítmény toxicitása jelentősen megnőtt POEA jelenlétében minden faj vizsgálata során (*P. subcapitata*, *D. subspicatus*: ($p < 0,001$); *S. obtusiusculus* $p = 0,005$). A készítmény esetében meghatározott

POEA-tartalomra korrigált és a POEA egyedi expozícióját követően meghatározott toxicitásértékek között nem figyelhető meg különbség a *P. subcapitata* ($p = 0,146$) és *D. subspicatus* ($p = 0,172$), *S. obtusiusculus* esetében azonban a formázóanyag egyedi toxicitása alacsonyabb ($p = 0,021$). A meghatározott 72h EC₅₀-értékek alapján jelentős különbség figyelhető meg a vizsgált fajok érzékenységeiben. A hatóanyag esetében a *P. subcapitata* és a *D. subspicatus* érzékenysége között nem tapasztalható különbség ($p = 0,467$), azonban a *S. obtusiusculus* jóval érzékenyebben reagált a GLY toxikus hatásaira ($p < 0,001$). A készítmény és a POEA esetében ezzel szemben az *S. obtusiusculus* volt a legtoleránsabb faj, amit a *D. subspicatus* követett, míg mindkét vizsgált anyag esetében a *P. subcapitata* bizonyult a legérzékenyebb zöldalgafajnak (ROUNDUP CLASSIC: $p < 0,001$; POEA: $p < 0,030$) (VI. táblázat).

VI. táblázat A ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek vizsgálata során meghatározott 72h EC₅₀-értékek a különböző zöldalgafajok esetében az optikai denzitás (OD) mérése alapján

Algafaj	72h EC ₅₀ -értékek (mg/l)*			
	GLY	ROUNDUP CLASSIC**		POEA
		GLY ekv.	POEA ekv.	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	125,2±16,5	12,2±3,1 5,1±1,3	1,9±0,5	2,6±0,7
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	132,9±2,3	34,0±6,9 14,1±2,9	5,3±1,1	4,4±0,4
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	73,1±21,2	65,8±9,0 27,3±3,7	10,2±1,4	6,9±1,6

* A vizsgált ható (GLY)- és formázóanyag (POEA) együttes toxicitását formázott készítmény formájában vizsgáltuk.

** A készítmény, ható- vagy formázóanyagra vonatkozóan feltüntetett 72h EC₅₀-értéke az adott ható-, vagy formázóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó készítményben jelen van.

Az OD-mérések alapján meghatározott toxicitási értékekhez hasonlóan a klorofill-a-tartalom mérései is azt mutatták, hogy a készítmény toxicitása magasabb a GLY egyedi toxicitásához képest a vizsgált zöldalgafajok esetében ($p < 0,001$). A GLY egyedi toxicitása a vizsgált cianobaktérium (*Anabaena flos-aquae*) esetében volt a legjelentősebb mértékű (17,4±6,0 mg/l) ($p < 0,001$), azonban a klorofill-a-tartalom alapján a két zöldalgafaj érzékenységeiben eltérés volt megfigyelhető, ugyanis a *D. subspicatus* érzékenyebbnek bizonyult (73,8±5,3 mg/l) a *P. subcapitata*-hoz képest (105,3±17,8 mg/l) ($p = 0,004$). A POEA egyedi hatása a klorofill-a-tartalom alapján is jóval toxikusabbnak bizonyult a GLY egyedi toxicitásához képest ($p < 0,001$), ahol ebben az esetben a *P. subcapitata* volt az érzékenyebb zöldalgafaj ($p < 0,001$). A hatóanyaggal ellentétben, a készítmény esetében meghatározott POEA-tartalomra korrigált és a

POEA egyedi vizsgálata során meghatározott toxicitási értékek között nem volt nagyságrendi különbség a vizsgált zöldalgafajok esetében (*P. subcapitata*: $p = 0,096$, *D. subspicatus*: $p = 0,896$). A két zöldalgafaj érzékenységében nem volt megfigyelhető különbség a készítménnyel történő kezelést követően ($p = 0,838$) (VII. táblázat).

VII. táblázat A ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek vizsgálata során meghatározott 72h EC₅₀-értékek a zöldalgafajok és egy cianobaktérium esetében a klorofill-a-tartalom alapján

Algafaj	GLY	72h EC ₅₀ -értékek (mg/l)*		POEA
		ROUNDUP CLASSIC** GLY ekv.	POEA ekv.	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	105,3±17,8	34,9±23,2 14,5±9,6	5,4±3,6	1,9±0,3
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	73,8±5,3	32,3±9,2 13,4±3,8	5,0±1,4	4,9±0,6
<i>Anabaena flos-aquae</i>	17,4±6,0	n.a. n.a.	n.a.	n.a.

* A vizsgált ható- (GLY) és formázóanyag (POEA) együttes toxicitását formázott készítmény formájában vizsgáltuk. (n.a.: nincs adat)

** A készítmény, ható- vagy formázóanyagra vonatkozóan feltüntetett 72h EC₅₀-értéke az adott ható-, vagy formázóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó készítményben jelen van.

A MEDALLON PREMIUM készítmény vizsgálata során az OD-méréseket követően meghatározott 72h EC₅₀-értékek alapján a GLY egyedi toxicitása a *P. subcapitata* esetében alacsonyabb a készítmény formájában vizsgált együttes toxicitásához képest ($p < 0,001$), a ROUNDUP CLASSIC készítményhez hasonlóan. A GLY egyedi toxicitása ezzel szemben jóval meghaladta a formázott készítmény esetében meghatározott együttes toxicitás mértékét a másik két vizsgált zöldalgafaj esetében (*D. subspicatus*: $p < 0,001$, *S. obtusiusculus*: $p = 0,002$) és a *S. obtusiusculus* bizonyult érzékenyebbnek a GLY kezelés hatásával szemben ($p = 0,001$). A POEA-hoz hasonlóan az APG egyedi toxicitása is meghaladta a hatóanyag egyedi toxicitását a *P. subcapitata* és a *D. subspicatus* algafajok esetében ($p < 0,001$), ahol a *P. subcapitata* bizonyult érzékenyebbnek ($p < 0,001$). Az *S. obtusiusculus* esetében azonban a hatóanyag egyedi toxicitása volt magasabb, a formázóanyag egyedi toxicitásához képest ($p = 0,008$). A készítmény esetében meghatározott APG-tartalomra korrigált és az APG egyedi vizsgálata során meghatározott toxicitási értékek között nem mutatkozott szignifikáns különbség a *S. obtusiusculus* ($p = 0,109$) esetében a POEA-hoz hasonlóan, a *P. subcapitata* esetében az egyedi toxicitás alacsonyabb ($p = 0,038$) ezzel szemben a *D. subspicatus* esetében jóval magasabb volt az együttes hatáshoz képest ($p = 0,001$). A meghatározott 72h EC₅₀-értékek alapján jelentős különbség figyelhető meg a

vizsgált fajok érzékenységében. A készítmény és az APG esetében is a *P. subcapitata* volt a legérzékenyebb faj (MEDALLON PREMIUM: $p < 0,001$, APG: $p \leq 0,001$), de amíg a MEDALLON PREMIUM esetében érzékenységbeli különbség nem volt megfigyelhető a másik két faj esetében ($p = 0,650$), addig az APG hatásaival szemben az *S. obtusiusculus* bizonyult toleránsabbnak ($p < 0,001$) (VIII. táblázat).

VIII. táblázat A MEDALLON PREMIUM és összetevőinek vizsgálata során meghatározott 72h EC₅₀-értékek a különböző zöldalga-fajok esetében az optikai denzitás (OD) mérése alapján

Algafaj	GLY	72h EC ₅₀ -értékek (mg/l)*		APG
		MEDALLON PREMIUM**		
		GLY ekv.	APG ekv.	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	125,2±16,5	125,7±13,7 42,7±4,7	18,9±2,1	23,0±2,3
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	132,9±2,3	720,9±96,6 245,1±32,8	108,1±14,5	64,3±12,9
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	73,1±21,2	687,5±171,9 233,8±58,4	103,1±25,8	137,9±19,1

* A vizsgált ható- (GLY) és formázóanyag (APG) együttes toxicitását formázott készítmény formájában vizsgáltuk.

** A készítmény, ható- vagy formázóanyagra vonatkozóan feltüntetett 72h EC₅₀-értéke az adott ható-, vagy formázóanyagnak azt a koncentrációját jelöli, amekkora koncentráción az 50%-os hatást kiváltó készítményben jelen van.

A *P. subcapitata* és *D. subspicatus* fajokon elvégzett vizsgálatok eredményei alapján a *D. magna* teszt-szervezeten tapasztalt tendenciának megfelelően a ROUNDUP CLASSIC készítmény és összetevőinek egyedi és kombinált toxicitásának vizsgálata során a POEA bizonyult a legtoxikusabb összetevőnek, majd a készítmény, míg a GLY egyedi toxicitása volt a legcsekélyebb mértékű Tsui és Chu (2003) eredményeihez hasonlóan.

A minták OD-értékének és klorofill-a-tartalmának meghatározását követően megállapított 72h EC₅₀-értékek között néhol nagyobb különbségek figyelhetők meg, azonban az eredmények és a toxicitásban megfigyelhető trendek jól követik egymást mindkét végpont esetében. A klorofill-a-tartalom alapján meghatározott toxicitási értékek általában alacsonyabbak az OD alapján számított 72h EC₅₀ értékeknél (VI. és VII. táblázatok). A 72h EC₅₀-értékek közötti különbségek feltételezhetően azzal magyarázhatók, hogy az OD meghatározását zavarhatja a sejtek aggregálódása és az elhalt sejtek maradványainak jelenléte a mintában, míg ezzel szemben a klorofill-a-tartalom analitikai meghatározása során ez a zavaró mátrix az extrakciót követően nincs jelen a mintában. Az elhalt növényi sejtekben a klorofill-a gyorsan bomlásnak indul, tehát az algaszaporodást gátló hatások becslése csak az élő sejtek alapján történik, így a klorofill-a-tartalom meghatározása megbízhatóbb és érzékenyebb végpontnak bizonyult.

A szakirodalmi adatok és saját eredményeink alapján jelentős különbségek figyelhetők meg a különböző alga- és cianobaktérium-fajok GLY hatóanyaggal szembeni érzékenységében (WONG 2000, ARUNAKUMARA *et al.* 2013, WANG *et al.* 2016), így nem meglepő, hogy az elérhető toxicitási adatok között is jelentős eltérések figyelhetők meg. A GLY- fitotoxikus hatásainak vizsgálata során a *P. subcapitata* esetében meghatározott 72h EC₅₀-értékek (125,2±16,5 és 105,3±17,8 mg/l) jóval meghaladják az elérhető irodalmi értékeket (24,7–41 mg/l) (TSUI és CHU 2003, EGEIS 2020). A *D. subspicatus* esetében meghatározott értékek (132,9±2,3 és 73,8±5,3 mg/l) jól illeszkednek az elérhető toxicitástartományba (72,9–166 mg/l) (GIESY *et al.* 2000, MACBEAN 2012, LEWIS *et al.* 2016). A *S. obtusiusculus* és az *A. flos-aquae* algafajokra elsőként határoztuk meg a GLY-izopropilammónium (IPA)-só (GLY-IPA) hatóanyagra vonatkozó 72h EC₅₀-értékeket.

Eredményeink alapján a GLY egyedi toxicitása jóval alacsonyabbnak bizonyult a vizsgált formázóanyagok egyedi toxicitásánál, kivéve egy esetet, ahol az APG egyedi toxicitása alacsonyabb volt a hatóanyag önálló toxicitásánál a *S. obtusiusculus* esetében ($p = 0,008$) (VIII. táblázat). A vizsgált formázóanyagok közül a *D. magna* tesztorganizmeneten tapasztalt hatásokhoz hasonlóan a POEA toxikusabbnak bizonyult az APG-nél ($p < 0,001$) (VII. és VIII. táblázatok). A POEA fitotoxicitási értékei (2,6±0,7 mg/l és 1,9±0,3 mg/l) nagyságrendileg megfelelnek a *P. subcapitata* fajon meghatározott irodalmi értékeknek (0,2–4,1 mg/l) (VAN GINKEL *et al.* 1993, TSUI és CHU 2003, RODRIGUEZ-GIL *et al.* 2017) (VI. és VII. táblázatok). A *S. obtusiusculus* és *D. subspicatus* zöldalgafajok esetében elsőként határoztuk meg a POEA-ra vonatkozó 72h EC₅₀-értékeket. Az APG esetében *P. subcapitata* fajon meghatározott 72h EC₅₀-értékek (23,0±2,3 mg/l) megfelelnek a hosszú szénláncú APG-vegyületek esetében meghatározott toxicitási tartománynak (C_{12–14}: 11–46 mg/l) (MADSEN *et al.* 1996, JURADO *et al.* 2012), viszont jóval meghaladják a Pavlic és munkatársai (2005) által C₁₀ szénláncú APG-vegyületek esetében meghatározott értéket (2,7 mg/l). A rövidebb szénláncú (C_{8–10}) APG-vegyületek esetében meghatározott 72h EC₅₀-érték *P. subcapitata* tesztorganizmeneten igen magasnak bizonyult (1113–1543 mg/l) (MADSEN *et al.* 1996, JURADO *et al.* 2012). A *D. subspicatus* esetében meghatározott toxicitási szint (64,3±12,9 mg/l) (VIII. táblázat), jóval meghaladják a különböző lánc hosszúságú APG-vegyületek esetében meghatározott átlagos 72h EC₅₀-értékeket (C_{8–10}: 21 mg/l, C_{12–14}: 6 mg/l) (STEBER *et al.* 1995), de főleg a Pavlic és szerzőtársai (2005) által meghatározott átlagértéket (C₁₀: 0,32 mg/l). Eredményeink alapján az APG hatásaival szemben legkevésbé érzékeny *S. obtusiusculus* esetében elsőként határoztuk meg az APG-re vonatkozó 72h EC₅₀-értéket. A szénlánc hosszával fokozódó toxicitást az alga tesztorganizmenetek esetében is több tanulmányban megfigyelték (STEBER *et al.* 1995, JURADO *et al.* 2012).

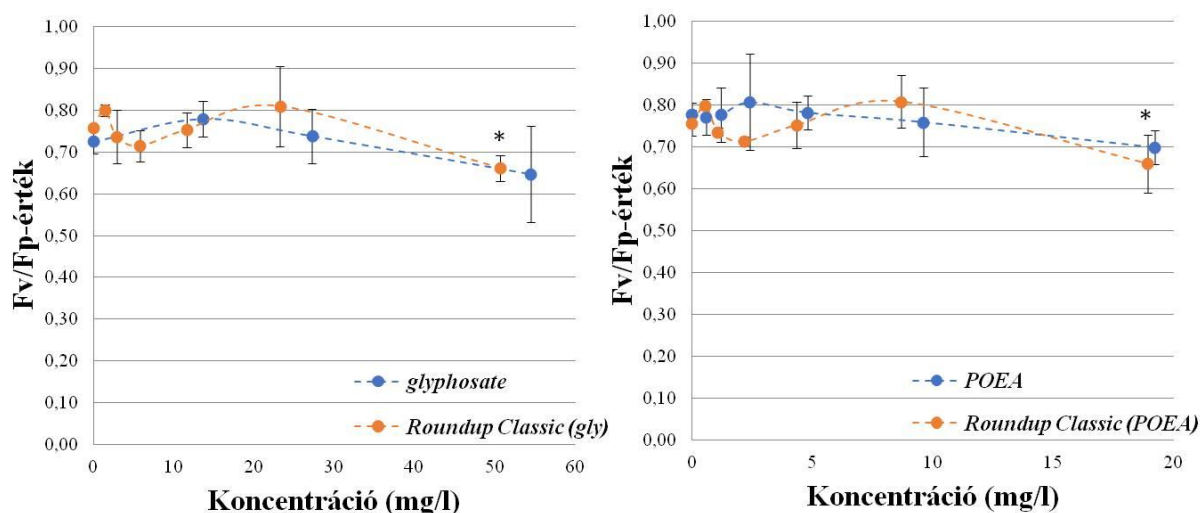
A GLY-tartalmú készítmények toxicitását alga tesztsszervezeteken több tanulmányban is vizsgálták (POWELL *et al.* 1991, SÁENZ és DI MARZIO 2009, EWACHA és GOLDSBOROUGH 2013). A *P. subcapitata* tesztsszervezeten, ROUNDUP CLASSIC esetében meghatározott toxicitásértékek (72h EC₅₀-értékek: 5,1±1,3 mg/l (GLY-tartalomra korrigált érték) nagyságrendileg megfelelnek a ROUNDUP készítmények esetében meghatározott 72h EC₅₀-értékeknek (0,7–5,8 mg/l) (LISEC 1989, TSUI és CHU 2003, EGEIS 2020), azonban jóval a Cedergreen és Streibig (2005) által meghatározott érték alatt maradnak (64,7 mg/l). A vizsgált készítmények biztonsági adatlapjain feltüntetett toxicitási értékek alga tesztsszervezetekre vonatkozóan: 72h EC₅₀-értékek: 2,1 mg/l (*P. subcapitata*, ROUNDUP CLASSIC) és 140 mg/l (*D. subspicatus*, MEDALLON PREMIUM) (MONSANTO EUROPE S.A. 2015, SYNGENTA 2018), amely értékek jóval alacsonyabbak az általunk meghatározott értékeknél mindkét készítmény esetében. A vizsgált készítmények toxicitását további szakirodalmi értékekkel nem tudtam összehasonlítani a megfelelő adatok hiányában. A készítmények fokozott toxicitását az adalékanyagok (pl. POEA) jelenlétében már több tanulmányban is igazolták (TSUI és CHU 2003, PEREIRA *et al.* 2009, LIPOK *et al.* 2010).

A különböző algafajok között tapasztalt érzékenységbeli különbségeket több tanulmányban is megfigyelték (WONG 2000, TSUI és CHU 2003, WANG *et al.* 2016), amely különbségek feltételezhetően a különböző algasejtek morfológiájában (pl. sejtek mérete és alakja, a sejtek fajlagos felületének és térfogatának aránya, kolóniaképzés), a sejtek biológiájában (pl. sejtfa permeabilitása, intracelluláris szerkezet) és a különböző fajok fiziológiájában (pl. növekedés, tápanyagfelvétel, metabolikus aktivitás) mutatkozó különbségekkel magyarázható (SCHÖNHERR 2002, EWACHA és GOLDSBOROUGH 2013).

A GLY és a POEA algasejtek fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatásait *P. subcapitata* zöldalgafajon vizsgáltuk a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát jellemző Fv/Fp-értékek és a fotoszintetikus aktivitást jellemző vitalitásindex (*Rfd*) -értékek alakulásának értékelésével. A vizsgált ható- és formázóanyag együttes toxicitását formázott készítmény (ROUNDUP CLASSIC) formájában is meghatároztuk.

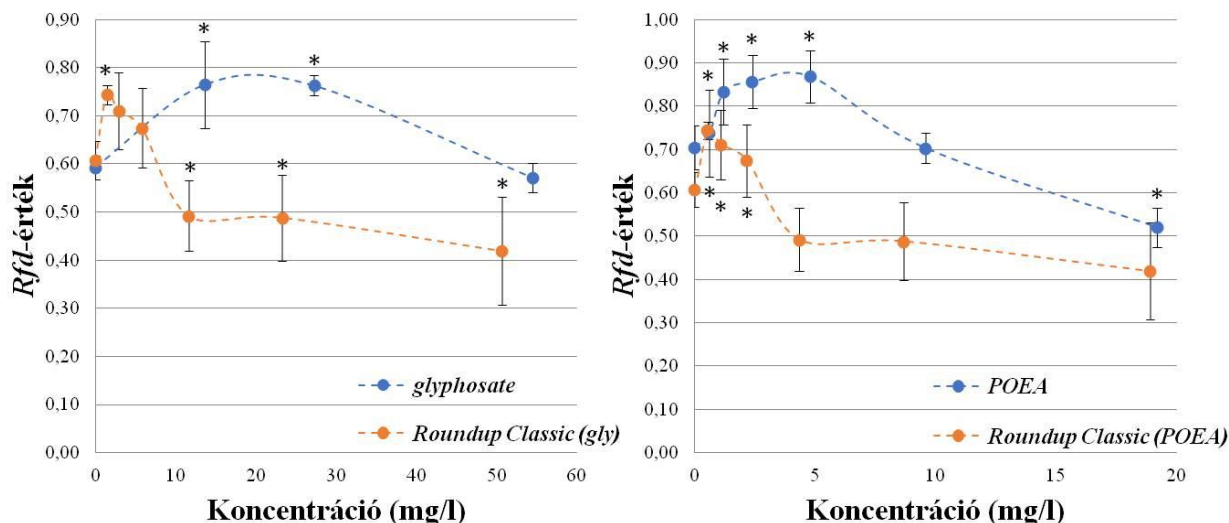
A GLY fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata során a tiszta hatóanyag nem eredményezte a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát jellemző Fv/Fp-értékek szignifikáns mértékű csökkenését a kontrollcsoportéhoz képest egészen a 109 mg/l koncentrációig ($p = 0,034$). A tiszta hatóanyaghoz hasonlóan a formázott készítmény csak a legtöményebb vizsgált koncentrációban (50,6 mg/l) eredményezte az Fv/Fp-érték szignifikáns csökkenését ($p = 0,015$) a kontrollcsoportéhoz képest. A POEA egyedi hatásainak vizsgálata során alkalmazott koncentrációtartományban (0,6–19,2 mg/l) nem tapasztaltuk az Fv/Fp-értékek szignifikáns

változását. A *POEA* készítmény formájában vizsgálva sem eredményezte a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságának szignifikáns változását a legmagasabb koncentrációig (18,9 mg/l), ahol azonban az érték szignifikáns mértékű csökkenése volt megfigyelhető a kontrollcsoporthoz képest ($p < 0,001$) (11. ábra – az *Fv/Fp*-értékeket a vizsgált összetevők közös koncentrációtartományában ábrázoltuk: *GLY*: 0–54,5 mg/l; *POEA*: 0–19,2 mg/l).



11. ábra A *glyphosate* (*GLY*) és a *POEA* hatása a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát jellemző *Fv/Fp*-értékek alakulására a vizsgált algasejtek esetében

A tiszta hatóanyag vizsgálata során az alacsony koncentrációk (13,6–27,2 mg/l) esetében az *Rfd*-értékek szignifikáns mértékű emelkedését figyeltük meg ($p < 0,025$), ezt követően a meghatározott értékek nem mutattak változást a kontrollcsoporthoz képest, még a legmagasabb koncentráció (436 mg/l) esetében sem ($p = 1,000$). A formázott készítmény esetében az alacsony vizsgálati koncentrációk (1,5–5,8 mg/l) esetében szintén az értékek növekedése volt megfigyelhető a kontrollcsoporthoz képest, azonban az emelkedés mértéke, csak a legalacsonyabb koncentrációnál volt szignifikáns mértékű ($p = 0,047$). A magasabb koncentrációtartományban (11,6–50,6 mg/l) az *Rfd*-értékek szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető ($p < 0,048$) (12. ábra – az *Rfd*-értékeket a vizsgált összetevők közös koncentrációtartományában ábrázoltuk: *GLY*: 0–54,5 mg/l; *POEA*: 0–19,2 mg/l). A *GLY* hatásaihoz hasonlóan a *POEA* alacsony koncentrációi (0,6–4,8 mg/l) esetében az *Rfd*-értékek szignifikáns emelkedését figyeltük meg a kontrollcsoporthoz képest ($p < 0,035$), a legmagasabb vizsgált koncentráció (19,2 mg/l) esetében azonban a *Rfd*-érték szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető ($p = 0,009$). A formázott készítmény esetében, a kezelés a *POEA* alacsony koncentrációtartományában (0,5–2,2 mg/l) szintén az értékek növekedését eredményezte a kontrollhoz képest (12. ábra).



12. ábra A *glyphosate* (GLY) és a *POEA* hatása a fotoszintetikus aktivitást jellemző *Rfd*-értékek alakulására a vizsgált algasejtek esetében

A fotoszintézist direkt módon gátló herbicidek (pl. *atrazine*) mellett, más hatóanyagok (pl. *GLY*) is hatással lehetnek a fotoszintézisre és a respirációs folyamatokra a különböző metabolikus útvonalakra gyakorolt hatásaikon keresztül (QIU *et al.* 2013, GOMES és JUNEAU 2016, 2017). A *GLY* hatásait a fotoszintetikus folyamatokra már több tanulmányban vizsgálták, amely fitotoxikus hatások kialakulása elsősorban közvetlen vagy közvetett módon a *GLY* által előidézett plasztokionon (a kloroplasztiszokban megtalálható kinonvegyületek, amelyek a fotoszintézis fényreakciójában az elektrontanszportlánc fontos elektronszállító molekulái) bioszintézisének gátlásával (COBB és READE 2010, GOMES *et al.* 2017) és a klorofillkoncentráció csökkenésével magyarázható (GOMES *et al.* 2016), amely közvetlen hatást gyakorol a kloroplasztisz elektrontranszportjának sebességére (GOMES és JUNEAU 2017). A *GLY*-expozíciót követően a mitokondriumban keletkező reaktív oxidatív gyökök is hatást gyakorolnak a fotoszintézis folyamatára, mivel gátlóan hatnak a respirációs elektrontranszportláncra, ugyanis a keletkező szabad gyökök elhagyva a mitokondriumot belépnek a kloroplasztiszba, ahol oxidatív károsodást idéznek elő a fotoszintetikus apparátusban, csökkentve a fotoszintetikus aktivitást (GOMES és JUNEAU 2016). Eredményeink alapján a *GLY* tiszta hatóanyag formájában nem eredményezte a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságának szignifikáns mértékű csökkenését a kontrollcsoportéhoz képest egészen a 109 mg/l koncentrációig, ezzel szemben *POEA* jelenlétében már 50,6 mg/l koncentrációnál megfigyelhető volt az Fv/Fp-érték szignifikáns csökkenése. A vitalitásindex (*Rfd*-érték) esetében a tiszta hatóanyag és a formázott készítmény esetében is az értékek emelkedése volt

megfigyelhető az alacsony koncentrációk [*GLY*: 13,6–27,2 mg/l, *ROUNDUP CLASSIC (GLY)*: 1,5–5,8 mg/l] expozíciója során, azonban a vitalitásindex csökkenése csak a formázott készítmény esetében volt megfigyelhető a vizsgált koncentrációtartomány esetében (12. ábra). A *GLY* algafajok fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatásainak vizsgálata során a hatóanyag PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságára gyakorolt kedvezőtlen hatását tapasztalták, többek között különböző zöldalgafajokon (köztük az általunk is vizsgált *P. subcapitata* faj) már 75 mg/l koncentrációtól és több kovaalgafaj esetében 15,3–37,5 mg/l koncentrációknál (*CHOI et al.* 2012), azonban eredményeinkhez hasonlóan alacsony vizsgálati koncentrációnál (0,02 mg/l) szintén a fotoszintetikus aktivitás növekedését tapasztalták egy lebegő egysejtű zöldalgafajon (*Scenedesmus quadricauda*) (*WONG* 2000).

A felületaktív anyagok (pl. *POEA*, *APG*) fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatásait magasabb rendű zöld növények levelein (*Brassica oleracea*, *Malus domestica*) vizsgálták, ahol a *M. domestica* leveleken egyik detergens esetében sem figyeltek meg szignifikáns elváltozást, ezzel szemben a *B. oleracea* esetében a *POEA* a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságának szignifikáns mértékű csökkenését eredményezte (*RASCH et al.* 2018). Vizsgálataink során a *POEA* csak formázott készítmény formájában, *GLY* jelenlétében idézte elő a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságának szignifikáns mértékű csökkenését a legtöményebb vizsgálati koncentrációban (18,9 mg/l). A *POEA* egyedileg és *GLY* jelenlétében is az *Rfd*-értékek növekedését idézte elő az alacsony vizsgálati koncentrációk esetében. A magasabb *POEA*-koncentrációtartományban ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabbak *Rfd*-értékeket tapasztaltunk a hatóanyag jelenlétében (12. ábra). A *ROUNDUP* készítmények esetében a *GLY* fitotoxikus hatása *POEA* jelenlétében jóval meghaladta a tiszta hatóanyag fotoszintetikus aktivitására gyakorolt toxicitását zöld- és kékalgafajokon (*M. aeruginosa*, *Nitella microcarpa* var. *wrightii*), azonban alacsony koncentráción szintén a fotoszintetikus aktivitás növekedéséről számoltak be, amely jelenség a hormézisz hatással magyarázható (*QIU et al.* 2013, *DE CAMPOS OLIVEIRA et al.* 2016). A hormézisz olyan biológiai jelenség, ahol egy káros hatású anyag az alacsony koncentrációtartományban kedvező vagy stimuláló hatást mutat (*MATTSON* 2007). Eredményeink alapján a *GLY* és a *POEA* esetében az *Rfd* érzékenyebb végpontnak bizonyult a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát jellemző Fv/Fp-értékeknél.

A fitotoxikus hatások vizsgálata során a formázott készítmény alacsony koncentrációjánál a kontrollcsoportokon tapasztalt hatásokhoz képest magasabb növekedési rátát (3,5 mg/l *ROUNDUP CLASSIC*) és megemelkedett fotoszintetikus aktivitást mértünk. Az alacsony vizsgálati koncentrációknál tapasztalt hormézisz a tiszta hatóanyag és a *POEA* esetében csak a fotoszintetikus aktivitást jellemző vitalitásindex vizsgálata során volt megfigyelhető, ugyanis az algaszaporodást jellemző végpontok (pl. Bürker-kamrás sejtszámlálás, klorofill-a-tartalom, OD)

alapján nem volt kimutatható a serkentő hatás a vizsgált alacsony koncentrációk esetében. A ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek, a GLY hatóanyagának, valamint formázóanyagának a POEA-nak algasejtek fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt egyedi és együttes hatásait vizsgálva minden kezelés esetében a hormézisz jelenségét tapasztaltuk a meghatározott *Rfd*-értékek esetében. A hormetikus hatás azonban az összetevők egyedi expozíciója során lassabban és később jelent meg, mint a formázott készítmény esetében, amelyet az egyedi és a két komponens együttes hatása közötti különbség eredményez. A fotoszintetikus paraméterekben tapasztalt változások esetünkben feltételezhetően a hormézisz jelenségével, valamint a toxikus hatások következtében kialakuló algabiomassza változásával magyarázhatók elsősorban. Alacsony koncentrációkon ugyanis még nem érvényesülnek a toxikus hatások, hanem épp ellenkezőleg, a kezelt algasejtek a GLY hatóanyagot szén-, foszfor- és nitrogénforrásként képesek hasznosítani (WONG 2000, SAXTON *et al.* 2011, QIU *et al.* 2013, WANG *et al.* 2016). A koncentrációnövekedéssel azonban már a toxikus hatások érvényesülnek a többlettápanyagtartalommal szemben. Egy *Pseudomonas*-faj vizsgálatában során egy nem ionos etoxilált hosszú láncú alkilamin (oktadecil-bisz-(2-hidroxi-etil)-amin, N,N-bisz-(hidroxi-etil)-sztearilamin) detergens esetében igazolták, hogy a vizsgált faj növekedése során a faggyúamin vegyületet szén és energiaforrásként használta fel (VAN GINKEL *et al.* 1993). Bizonyos tanulmányok alapján a hormézisz a növényi szervezet fokozott stresszhelyzetre adott válaszként is értelmezhető (JALAL *et al.* 2021).

4.4. Biofilmekben végzett közösségi szintű vizsgálatok eredményei

A 2015. évi vizsgálatokban folyamatosan mértük a biofilm növesztési helyéről származó természetes vízminták (Balaton, Duna) növényvédő szeres terhelését a kolonizáció és a laboratóriumi expozíció időtartama alatt, és a GLY egyik felszíni vízben sem volt kimutatható.

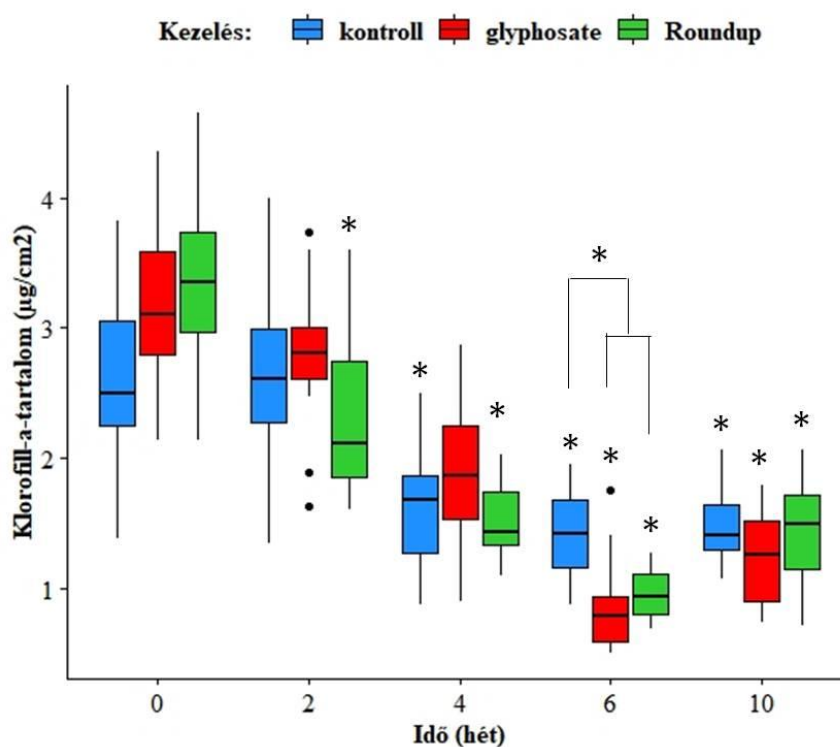
A biofilm-kolonizáció szakaszában a Dunából származó felszínivízmintákból hosszabb ideig kimutatható volt a *metolachlor* (1 µg/l-ig) és esetenként a *terbuthylazine* és *dimethendamid* jelenléte (1 µg/l-ig) is, továbbá július közepétől a mintavételezés végéig *chloryrifos* jelenléte volt kimutatható a vizsgált felszínivízmintákban 2–4 µg/l közötti koncentrációban.

A Balatonból származó vízmintákban az általunk választott módszerrel kimutatható növényvédőszer-hatóanyagok jelenléte nem volt kimutatható a biofilmnövesztési periódus során, a későbbiekben azonban itt is megjelent a *chloryrifos* a dunai vízminták esetében meghatározott koncentrációtartományban.

4.4.1. A glyphosate hatásai balatoni és dunai biofilmek algaközösségeinek biomasszájára és a biofilmek szerkezetére

A GLY hatásait a természetes körülmények között kialakult balatoni és dunai biofilmek algaközösségeinek biomasszájára, tiszta hatóanyag és formázott készítmény formájában vizsgáltuk 2015 tavaszán (13–14. ábra).

A balatoni biofilmek esetében a kialakult biomassza (BM) -értékek $[BM(t_0)]$ között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a vizsgálatba vont egységekben ($p > 0,067$). A külső és belső mérési pontokban kialakult $BM(t_0)$ -értékek között szintén nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,415$). Az üveglapok sima felületén szignifikánsan magasabb $BM(t_0)$ -értékeket határoztunk meg a homokfűvott felületen kialakult értékekhez képest ($p = 0,035$). A felület hatása azonban nem különbözött szignifikánsan az egyes kezelési csoportokban ($p > 0,677$), valamint a kezelés és idő együttes hatása (interakciók) sosem volt szignifikáns a felállított modellekben, továbbá minden csoportba mindkét felületből ugyanannyi jutott, így a felület hatását nem tartottuk fontosnak az eredmények értékelésénél. A mérési pontokban kialakult $BM(t_0)$ -értékek nem voltak hatással az expozíció során kialakult BM-értékekre ($p = 0,806$).



13. ábra A glyphosate és formázott készítményének hatásai a 2015. tavaszán a Balatonban természetes körülmények között kialakult biofilmek algaközösségeinek klorofill-a-tartalmára

A rövidtávú hatások statisztikai elemzése során a 0. és 2. hét között a kontrollcsoportban nem volt megfigyelhető szignifikáns változás ($p = 0,850$). A kezelt csoportokban ezzel szemben

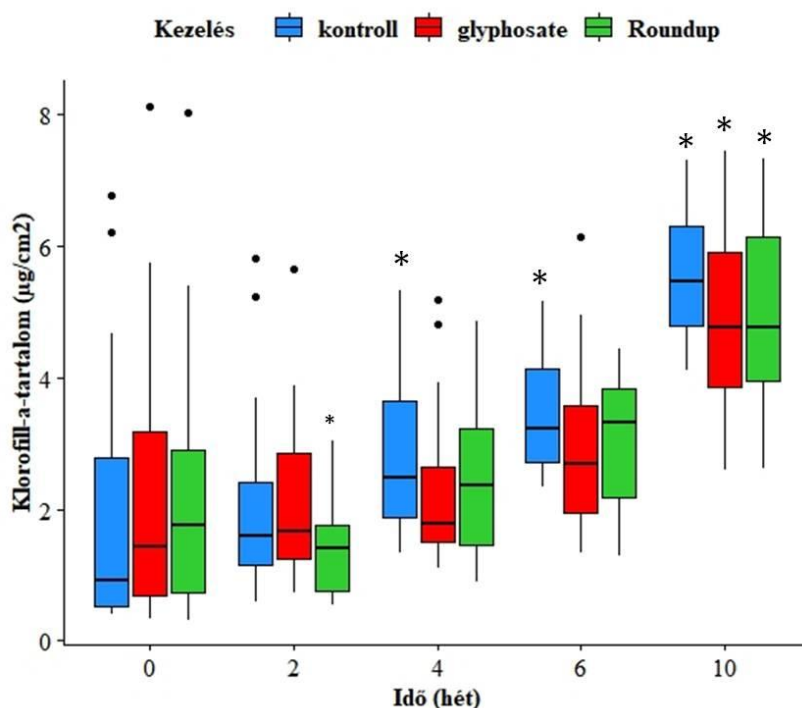
a BM-értékek átlagának lecsökkenése volt tapasztalható a 2. hétre, de csak a formázott készítmény esetében volt szignifikáns mértékű a változás ($p < 0,001$). A 4. hétre a BM-értékek átlagának lecsökkenése volt megfigyelhető a kiindulási állapothoz képest a kontrollcsoportban ($p < 0,001$) és a kezelt csoportokban egyaránt, azonban a csökkenés mértéke továbbra is csak a formázott készítmény esetében volt szignifikáns ($p < 0,001$). Eredményeink alapján az algaközösség biomasszájának csökkenése volt megfigyelhető a kezeletlen kontroll- és kezelt csoportokban egyaránt a 6. hétig. A 6. héten a kezelt csoportok átlagos BM-értéke szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontrollban ($p < 0,001$). A 10. héten meghatározott BM-értékek átlaga meghaladja a 6. heti értékeket azonban a változás nem szignifikáns ($p = 0,578$), a kezelt csoportokban azonban a biomassa átlaga a 6. és 10. hét között idővel megemelkedett ($p < 0,001$), míg a kontrollcsoport esetében nem történt változás. A 10. héten a csoportok átlagos BM-értékei között már szignifikáns különbség nem volt tapasztalható ($p > 0,087$) (13. ábra).

A statisztikai modellalkotás során a dunai adatsor esetében a kezdeti modell rossz illeszkedése és a könnyebb értelmezhetőség miatt a modellt nem az adott időpontban, mérési pontoként meghatározott BM-értékekre, hanem azok kezdeti klorofill-a-tartalmától való eltérésére $[BM(t)-BM(t_0)]$ állítottuk fel. A BM-értékek alakulása erősen összefügg a kezdeti $BM(t_0)$ -értékekkel, így magyarázó változóként ez utóbbi transzformált változata [az átlagos $BM(t_0)$ -tól való eltérésként] is bekerült a modellbe. A transzformációnak köszönhetően a modell referenciacsoportja az átlagos $BM(t_0)$ -értékkel rendelkező, kezelés nélküli pontok csoportja lett.

A dunai biofilmek esetében az expozíciót megelőzően kialakult $BM(t_0)$ -értékek között sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a vizsgált egységek esetében ($p > 0,276$). A külső és belső mérési pontokban meghatározott $BM(t_0)$ -értékek nem tértek el egymástól szignifikáns mértékben ($p = 0,152$). A vizsgált üveglapok homokfűvott és sima felületén meghatározott $BM(t_0)$ -értékek között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,569$). A felület és a mérési pont elhelyezkedése nem gyakorolt szignifikáns hatást a meghatározott BM-értékekre. A mérési pontokban kialakult $BM(t_0)$ -értékek hatással voltak az expozíció során kialakult BM-értékekre ($p < 0,001$), ugyanis a kiugróan magas $BM(t_0)$ -értékkel rendelkező mérési pontokban a BM-értékek alakulása jelentős mértékben eltért a kezdetben közepes vagy alacsony $BM(t_0)$ -értékek dinamikájától. Az átlagosnál nagyobb $BM(t_0)$ -értékkel rendelkező kontrollmintákban szignifikánsan erőteljesebb volt a biomassa csökkenése az első két hétben ($p < 0,001$). A kezelt csoportokban ezzel szemben a nagyobb kezdeti biomassa kevésbé hatott negatívan a biomasszára ($p > 0,096$).

A rövidtávú hatások elemzése során láthatóvá vált, hogy egy átlagos kezdeti biomasszájú kontrollminta biomasszája nem változott szignifikáns mértékben az első két hétben ($p = 0,599$).

A GLY-kezelt csoportban sem mutatkozott szignifikáns mértékű változás ($p = 0,325$). Ezzel szemben a formázott készítménnyel kezelt csoport esetében a biomassza szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető a kontroll- és GLY-kezelt csoportokhoz képest ($p < 0,036$). A 0. és 4. hét között a kontrollcsoportban egy erőteljesebb növekedés volt tapasztalható ($p = 0,012$), ezzel szemben a tiszta hatóanyaggal kezelt csoportban egy átlagos kezdeti biomasszával jellemezhető minta esetében nem volt tapasztalható szignifikáns mértékű változás ($p = 0,160$). A formázott készítmény esetében viszont a kezdeti szignifikáns csökkenést a biomassza növekedése váltotta fel. A 0. és 4. hét között tapasztalt növekedéshez képest a 0. és 6. hét között a növekedés üteme mintegy duplájára emelkedett a kontroll- és GLY-kezelt csoportokban, ezzel szemben a formázott készítménnyel kezelt csoportban a növekedési ütem hozzávetőlegesen a háromszorosára emelkedett egy átlagos kezdeti biomasszájú minta esetében ($p < 0,001$), de a csoportok változásának mértéke között nem volt szignifikáns különbség ($p > 0,083$). A kísérlet végére a kontroll- és kezelt csoportok növekedésének mértéke lelassult egy átlagos kezdeti biomasszájú minta esetében, ami feltételezhetően a rendszer eltartóképességének megközelítésével magyarázható. A csoportok növekedési üteme között statisztikai különbség nem volt megfigyelhető ($p > 0,401$) (14. ábra).

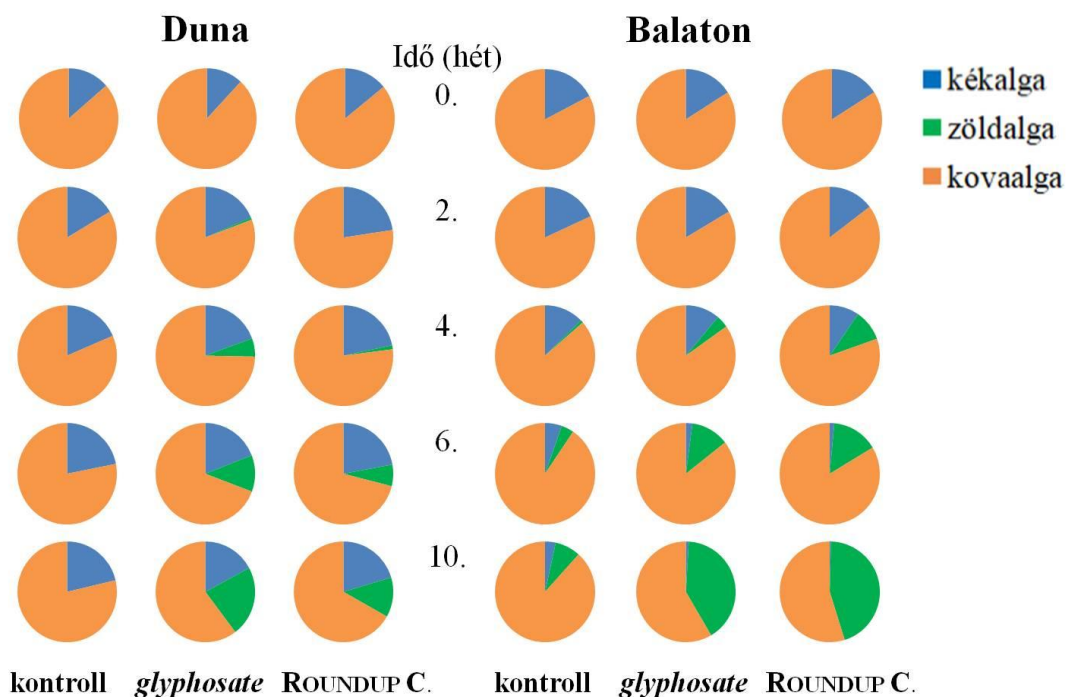


14. ábra A *glyphosate* és formázott készítményének hatásai a 2015. tavaszán a Dunában természetes körülmények között kialakult biofilmek algaközösségeinek klorofill-a-tartalmára

Szintén 2015-ben a biofilmek algaközösségeinek biomasszájára gyakorolt hatások mellett az algaflóra által meghatározott három algacsoport arányaira gyakorolt hatásokat is vizsgáltuk (15. ábra). Az algacsoportok arányaiban nem volt eltérés a két természetes víztestben növesztett

biofilmek között (kovaalgák: $p = 0,594$, kékalgák: $p = 0,882$), továbbá az expozíciót megelőzően a vizsgálatba vont egységek esetében sem volt megfigyelhető különbség az algaközösség összetételében (Duna: $p \geq 0,796$, Balaton: $p \geq 0,947$). Az expozíciót megelőzően gyűjtött mintákban zöldalgák jelenlétét egy esetben sem igazoltuk a mérések alapján.

A dunai biofilmek (kontroll: kovaalgák: 86,4%, kékalgák: 13,6%; *GLY*: kovaalgák: 88,1%, kékalgák: 11,9%; ROUNDUP CLASSIC: kovaalgák: 85,9%, kékalgák: 14,1%) esetében a kovaalgák csökkenése volt megfigyelhető az algafáklyás mérések alapján minden csoport esetében a kísérlet végére [kontroll: 78,7% ($p = 0,212$); *GLY*: 60,3% ($p < 0,001$); ROUNDUP CLASSIC: 66,9% ($p = 0,003$)], a csökkenés azonban csak a *GLY*-kezelt csoportokban volt szignifikáns mértékű. A vizsgált biofilmekben a kísérlet teljes időtartama alatt a kovaalgák dominanciája volt jellemző ($p > 0,050$). A kékalgák aránya nem változott szignifikáns mértékben a kezeletlen és kezelt biofilmekben ($p \geq 0,187$). A kísérlet végére a zöldalgák megjelenése volt megfigyelhető a kezelt csoportokban. A tiszta hatóanyag esetében a 2. héten detektáltuk először a zöldalgák megjelenését (0,7%), amelyet követően arányuk szignifikánsan megnőtt a 10. hétre elérte a 22,6%-ot ($p < 0,001$). A formázott készítmény esetében a 4. héten mértünk először zöldalgát (1,3%) a vizsgált mintákban, de a csoport aránya itt is növekedést mutatott az expozíció során ($p = 0,003$), azonban a kísérlet végére kialakult arány (12,8%) statisztikailag nem különbözött a tiszta hatóanyag esetében meghatározott értéktől ($p = 0,103$) (15. ábra).



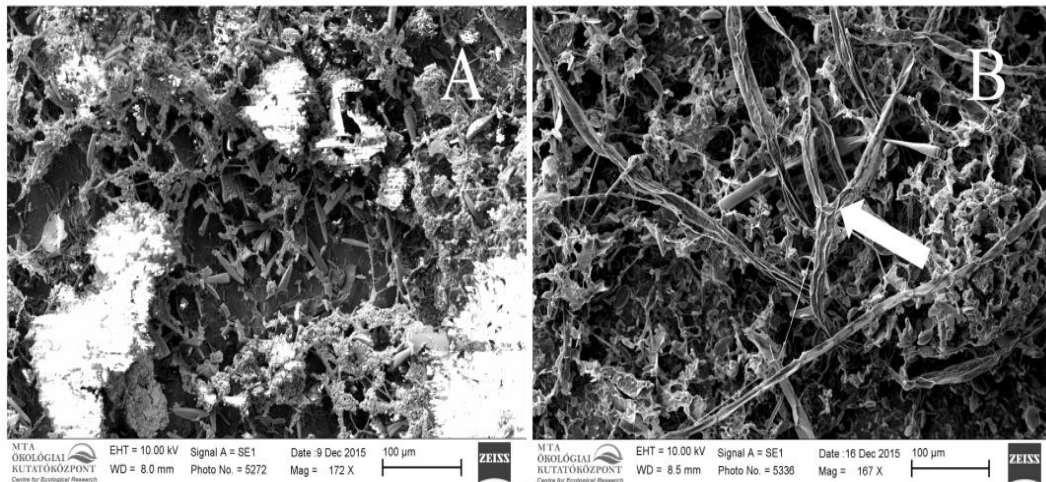
15. ábra A *glyphosate* és formázott készítményének (ROUNDUP CLASSIC) hatása a 2015-ben természetes körülmények között kialakult dunai és balatoni biofilmek algaközösségeire

A Balatonból származó felszíni biofilmek (kontroll: kovaalgák: 82,7%, kékalgák: 17,3%; GLY: kovaalgák: 84,0%, kékalgák: 16,0%; ROUNDUP CLASSIC: kovaalgák: 83,9%, kékalgák: 16,1%) esetében a kovaalgák arányában nem tapasztaltunk jelentőst változást a 10-hetes expozíció során a kontrollcsoport esetében ($p = 0,356$). A kezelt csoportokban ezzel szemben jelentős mértékben lecsökkent a kovaalgák aránya a kísérlet végére [GLY: 58,5% ($p < 0,001$); ROUNDUP CLASSIC: 54,8% ($p < 0,001$)], de a vizsgált biofilmekben a kísérlet teljes időtartama alatt a kovaalgák dominanciája volt a jellemző minden csoport esetében ($p > 0,050$). A kékalgák aránya minden csoport esetében folyamatos csökkenést mutatott a kezeletlen és kezelt biofilmekben egyaránt a 10. hétre [kontroll: 3,4% ($p = 0,003$); GLY: 0,9% ($p < 0,001$); ROUNDUP CLASSIC: 0,4% ($p < 0,001$)]. A kísérlet végére a zöldalgák jelenléte a kontroll- és kezelt csoportokban is megfigyelhető volt. A zöldalgák megjelenését minden csoportban a 4. héten detektáltuk először (kontroll: 0,8%; GLY: 4,0%; ROUNDUP CLASSIC: 1,0%), ezt követően arányuk szignifikáns növekedést mutatott az expozíciós időszak során [kontroll: 8,3% ($p = 0,027$); GLY: 40,6% ($p < 0,001$); ROUNDUP CLASSIC: 44,8% ($p < 0,001$)]. A kísérlet végére a zöldalgák aránya a kezelt csoportokban jóval meghaladta a kontrollcsoportban meghatározott értéket (GLY: $p < 0,001$; ROUNDUP CLASSIC: $p < 0,001$) (15. ábra).

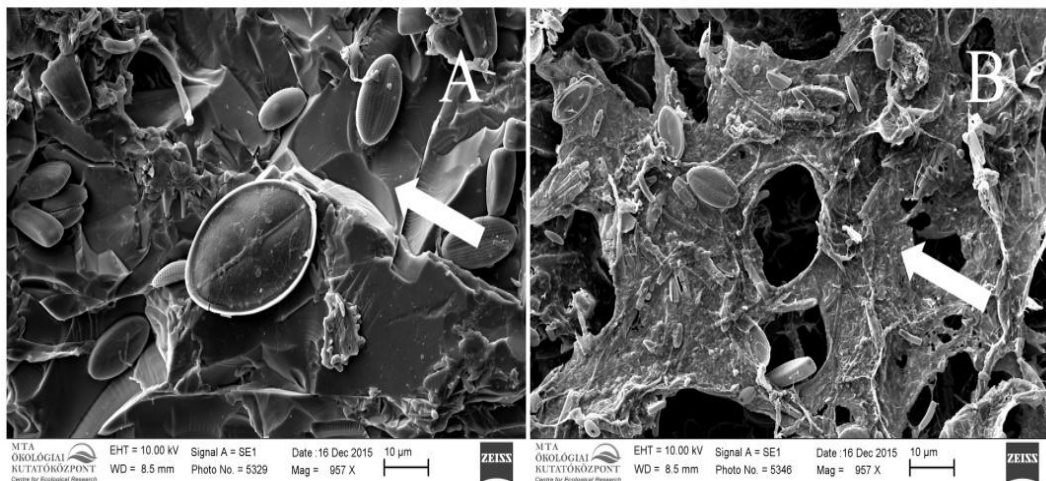
A kezelt biofilmek algaközösségeinek átrendeződése volt jellemző, ugyanis a GLY toxikus hatásaival szemben érzékenyebb fajok (pl. *Nitzschia fonticola*, *Nitzschia cryptotenella*, *Gomphonema parvulum*) helyét toleránsabb főként fonalas zöldalgafajok (pl. *Oedogonium*- és *Spirogyra*-fajok) vették át, amelyek feltételezhetően képesek a vizsgált anyagokat tápanyagforrásként hasznosítani (SAXTON *et al.* 2011, QIU *et al.* 2013, WANG *et al.* 2016) (15. ábra). A GLY hatásait a felszíni vízi biofilmek algaközösségeinek átrendeződésére és a mikrobiális közösség struktúrájára több tanulmányban is vizsgálták (PÉREZ *et al.* 2007, SHAW és MIBBAYAD 2016). Az algaközösség összetételében megfigyelt változásokat a SEM vizsgálatok is megerősítették (16. ábra).

A mikroszkópos elemzés során szintén a kovaalgafajok dominanciája volt megfigyelhető. A kísérlet végére a kezelt csoportokban a fonalas zöldalgák jelentős mértékű megjelenése volt jellemző a kontroll- és expozíció előtti kiindulási állapothoz képest (15–16. ábra), továbbá a kezelések hatására a biofilmek mikroorganizmusok közösségei által termelt extracelluláris polimeranyagok (EPS) fokozott termelődése volt megfigyelhető a kezelt biofilmekben a kontrollcsoportéhoz képest, főleg POEA jelenlétében (17. ábra). A SEM-felvételek alapján szintén követhető volt a Balatonból származó biofilmek algasejtszámának fokozatos csökkenése, továbbá a zöldalgák megjelenése és a fokozott EPS-termelés ebben az esetben is megfigyelhető volt a kezeléseket követően. A jelenség feltételezhetően a biofilmek baktérium- és

algaközösségének védelmi mechanizmusával magyarázható, amely során a fokozott *EPS*-termelés a különböző szennyező anyagok káros hatásainak kiküszöbölésére és csökkentésére irányul (WINGENDER *et al.* 1999, DOMOZYCH 2007, FLEMMING és WINGENDER 2010), továbbá a *GLY* képes befolyásolni a baktériumok és algák anyagcsere-folyamatait, amely szintén előidézheti a fokozott *EPS*-termelést, így a tapasztalt jelenség a kedvezőtlen fizika, kémia és biológiai hatásokra adott stresszválaszként is értelmezhető a biofilmek esetében.



16. ábra Fonalas zöldalgák megjelenése (fehér nyíl) dunai biofilmekben (A: kontrollbiofilm, B: kezelt biofilm) a *glyphosate* kezelés hatására (fotó: Dr. Ács Éva)



17. ábra Az *EPS* fokozott termelődése (fehér nyíl) dunai biofilmekben (A: kontrollbiofilm, B: kezelt biofilm) esetében a ROUNDUP CLASSIC kezelés hatására (fotó: Dr. Ács Éva)

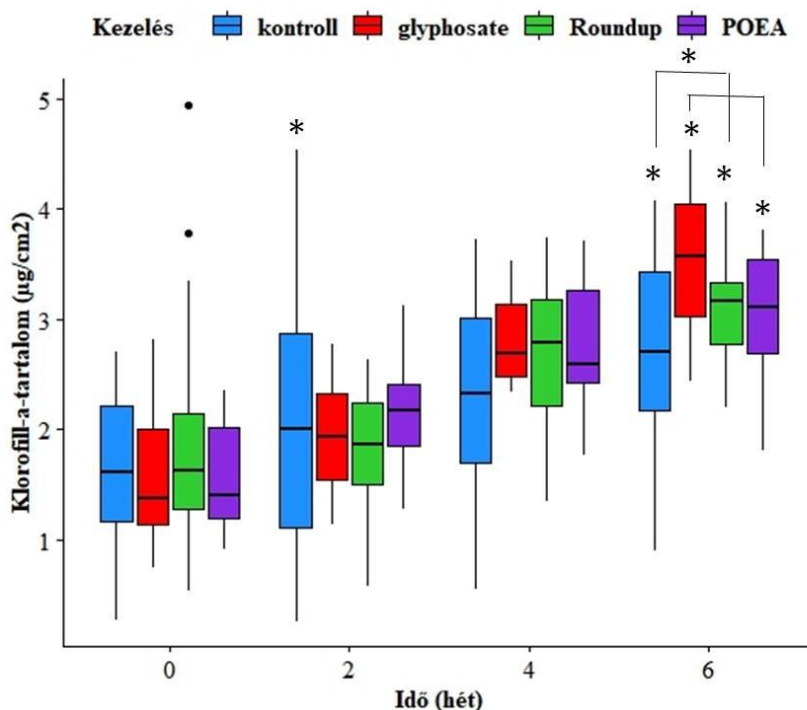
4.4.2. A *glyphosate*-tartalmú ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek hatásai dunai és velencei-tavi biofilmek algaközösségeinek biomasszájára

A 2016 évi dunai adatsor esetében a kezdeti modell rossz illeszkedése és a feltételek sérülése miatt szintén változtatásokra volt szükség. A kezdeti modellek szerint a mérési pontokban kialakult kezdeti BM-értékek $[BM(t_0)]$ és a mérési pont elhelyezkedése a lemezeken szignifikánsan hatott a későbbi értékek alakulására ($p < 0,001$), ráadásul mindkét paraméter interakcióban van a kezeléssel, tehát máshogy hatnak az egyes kezelési csoportokban. A két változó egymással is kapcsolatban állt, így ebben a modellben az időt folytonos változóként kezeltük, ezzel a $BM(t_0)$, mint önálló magyarázó változó kikerült a modellből. Habár a mérési pont elhelyezkedése önmagában és a kezeléssel interakcióban is hatott a BM-értékek alakulására, a modell nem volt túl jó a külső pontokon lévő kiugró értékek miatt, így először külön teszteltük a modell illeszkedését a külső és belső mérési pontokban, majd a kiugró adatsorból való eltávolítása mellett döntöttünk. A kiugró értékek eltávolításával jól illeszkedő és a feltételeknek megfelelő modellt kaptunk a külső és belső mérési pontok szeparálása nélkül.

A 2016-ban természetes körülmények között a Dunában kialakult $BM(t_0)$ -értékek esetében sem találtunk különbséget a vizsgált egységek esetében az expozíciót megelőzően ($p > 0,091$) A mérési pont elhelyezkedése önmagában hatással van a $BM(t_0)$ -értékek alakulására ($p < 0,001$), azonban a kiugró értékek eltávolításával a mérési pont elhelyezkedése és a kezelések közötti interakciók nem voltak szignifikánsak ($p > 0,050$). A külső mérési pontokon szignifikánsan nagyobb $BM(t_0)$ -értékeket határoztunk meg, mint a belső mérési pontok esetében ($p < 0,001$), és ez a különbség végig fennállt a vizsgálat teljes időtartama alatt. A vizsgált üveglapok homokfűvott és sima felületén meghatározott $BM(t_0)$ -értékek között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést ($p = 0,315$). Az üveglap felülete nem gyakorolt szignifikáns hatást a meghatározott $BM(t_0)$ -értékekre ($p = 0,802$). A mérési pontokban kialakult $BM(t_0)$ -értékek azonban pozitív hatást gyakoroltak az expozíciót követően kialakult BM-értékekre ($p < 0,001$), ugyanis a magasabb kezdeti biomasszával jellemezhető mérési pontokban jóval magasabb értékek voltak megfigyelhetők, ez a jelenség azonban nem állt fenn a kezelt csoportokban.

A rövidtávú hatások statisztikai elemzése során láthatóvá vált, hogy a 0. és 2. hét között a BM-értékek átlaga szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoportban ($p < 0,001$). A kontrollcsoporthoz képest a BM-értékek átlagának lassabb növekedése volt megfigyelhető a tiszta és formázott hatóanyaggal kezelt csoportokban, ezzel szemben a POEA-val kezelt csoportban a kontrollcsoporthoz képest gyorsabb növekedés volt tapasztalható az átlagértékek alapján, a megfigyelt változások azonban statisztikailag nem szignifikáns mértékűek feltételezhetően a nagy szórások miatt ($p > 0,307$). A hosszútávú hatások értékelése alapján elmondható, hogy idővel a biomassza minden csoportban megnövekedett ($p < 0,001$). A 4. héttől azonban a biomassza gyorsabb növekedése volt megfigyelhető a kezelt csoportokban a

kontrollhoz képest ($p < 0,001$), a formázóanyag egyedi expozíciója során a változás azonban statisztikailag nem szignifikáns ($p = 0,072$). A kísérlet végére a kezelt csoportok átlagos BM-értékei szignifikáns mértékben meghaladták a kontroll esetében meghatározott értéket ($p < 0,001$). A kezelt csoportok között azonban nem figyelhető meg különbség ($p > 0,883$) (18. ábra).



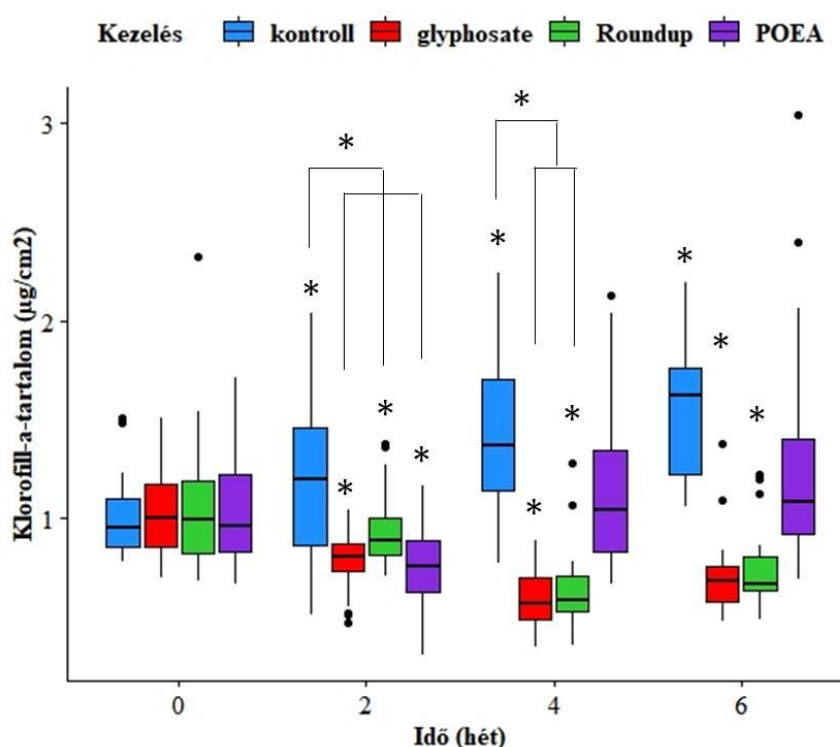
18. ábra A *glyphosate* és a *POEA* egyedi és kombinált hatásai a 2016. tavaszán a Dunában természetes körülmények között kialakult biofilmek algaközösségeinek klorofill-a-tartalmára

A velencei-tavi adatsor esetében is szignifikánsnak bizonyult a kezdeti modellben a mérési pont elhelyezkedésének önálló hatása és a kezeléssel együttes interakciója is, továbbá a modell illeszkedése sem bizonyult megfelelőnek. 2016-tól egy lemezen kétszer annyi külső, mint belső pontot mértünk, ezért a modell végrehajtása előtt készítettünk egy leválogatást, ahol minden belső ponthoz random kiválasztottuk az egyik külső ponton meghatározott értéket (8. ábra). A lefutott modellben ezt követően a mérési pont elhelyezkedésének továbbra is szignifikáns hatása volt, de interakciója a kezeléssel már nem maradt szignifikáns mértékű ($p \geq 0,101$). A végső modellben így az adatok eltávolítása elkerülhetővé vált, a megfelelő illeszkedés és a feltételek teljesülése mellett.

A Velencei-tavi biofilmek algaközösségeinek $BM(t_0)$ -értékei sem különböztek szignifikáns mértékben egymástól a vizsgált egységek esetében ($p > 0,089$). A külső mérési pontokon szignifikánsan magasabb $BM(t_0)$ -értékeket tapasztaltunk a belső mérési pontokhoz képest ($p = 0,027$). A vizsgált üveglapok homokfűvott felületen és sima felületén meghatározott $BM(t_0)$ -értékek statisztikailag nem különböztek egymástól ($p = 0,241$). A felületnek nem volt

hatása a BM-értékek alakulására az expozíció során ($p = 0,299$). A mérési pont elhelyezkedése néhol hatást gyakorolt a kialakult BM-értékekre, de ez a hatás nem különbözik szignifikánsan az egyes kezelési csoportokban, így a külső és belső mérési pontokban megfigyelhető különbségek hatását nem tartottuk fontosnak az eredmények értékelése során. A mérési pontokban kialakult $BM(t_0)$ -értékek nem voltak hatással az expozíció során kialakult BM-értékekre ($p = 0,682$).

A rövidtávú hatások statisztikai elemzése során, a 0. és 2. hét között a BM-értékek átlagának szignifikáns mértékű emelkedése volt megfigyelhető a kontrollcsoportban ($p = 0,011$), ezzel szemben a kezelt csoportokban a biomasza átlagos értéke szignifikánsan lecsökkent a 2. hétre ($p < 0,004$). A 2. héten a kezelt csoportok BM-értékeinek átlaga szignifikánsan kisebb volt a kontrollcsoportban meghatározott értékhez képest ($p < 0,005$) (19. ábra).



19. ábra A *glyphosate* és a *POEA* egyedi és kombinált hatásai a 2016. tavaszán a Velencei-tóban természetes körülmények között kialakult biofilmek algaközösségeinek klorofill-a-tartalmára

A 4. hétre a biomasza további növekedése volt megfigyelhető a kiindulási állapothoz képest a kontrollban ($p < 0,001$). A *GLY*-kezelt csoportok esetében továbbra is, sőt még jelentősebb csökkenés volt megfigyelhető a kontrollhoz képest ($p < 0,001$). A 4. héten a tiszta hatóanyaggal és formázott készítménnyel kezelt csoportok BM-értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollcsoport esetében meghatározott értékekhez képest ($p < 0,001$), azonban a hatóanyaggal és a készítménnyel kezelt csoportok között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,384$). A 6. héten továbbra is a biomasza szignifikáns növekedése volt tapasztalható a kontrollcsoport esetében ($p < 0,001$), míg a *GLY*-kezelt csoportokban az

expozíció végén is szignifikáns csökkenés volt tapasztalható ($p < 0,001$) a kiindulási értékhez képest. A 4. héten meghatározott értékekhez képest azonban nem volt megfigyelhető változás a vizsgált csoportokban ($p > 0,050$), így a csoportok közötti különbségek sem változtak a vizsgálat végére. A hosszútávú hatások elemzése alapján elmondható, hogy a 2. és 6. hét között a POEA-kezelt és a kontrollcsoport között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,234$), ezzel szemben a GLY-expozíció a BM-értékek szignifikáns csökkenését idézte elő ($p < 0,001$) (19. ábra).

A természetes felszíni biofilmeken végzett vizsgálataink alapján elmondható, hogy a Dunából és a Velencei-tóból származó biofilmek jól adaptálódtak a laboratóriumi körülményekhez, ugyanis a kísérlet teljes időtartama alatt nem volt megfigyelhető az algabiomassza szignifikáns mértékű csökkenése a kezeletlen kontrollbiofilmek esetében (14., 18–19. ábra). A Balatonból származó biofilmek esetében ezzel szemben a kezeletlen biofilmek leépülése volt megfigyelhető laboratóriumi körülmények között (13. ábra). A biofilm-kolonizációt követően a Balatonból származó biofilmek esetében az élőbevonat felszínén nagy mennyiségben voltak megfigyelhetők elősorban különböző árvaszúnyogfajok, de feltételezhetően más, például *Amphipoda*-fajok (pl. *Corophium curvispinum*) bentikus csöcképző lárvái (ENTZ és SEBESTYÉN 1942, MUSKÓ és GÖRÖG 2000). A Tihanyi-félszigeten leggyakoribb árvaszúnyogfajok, a *Procladius choreus*, *Tanyus punctipennis* és *Chironomus balatonicus* (SPECZIÁR 2008, ÁRVA *et al.* 2015) lárváinak – különösen a *Procladius*-fajoknak – feltételezhetően esszenciális szerepük lehet a biofilmközösség szelekciójában és fenntartásában, amely fauna hiányában a laboratóriumi körülmények között a biofilmek elkezdtek leépülni az akváriumokban már két hét elteltével.

A GLY-kezelés hatására a különböző években, a természetes vizekben növesztett, biofilmek vizsgálata esetében a tiszta hatóanyag az algabiomassza kismértékű csökkenését idézte elő a vizsgált állóvizek esetében [2015: Balaton (13. ábra), 2016: Velencei-tó (19. ábra)], habár a Balaton esetében a kezeletlen biofilmek jelentős mértékű pusztulása is megfigyelhető. A GLY bizonyos esetekben az algabiomassza növekedését idézte elő [Duna: 2015, 2016 (14. és 18. ábra)], azonban esetenként csak a biomassza kezdeti csökkenését követően (2015: Balaton (13. ábra), ami nem meglepő, ugyanis a szakirodalomban is ismert, hogy a GLY alacsony vizsgálati koncentrációkban (0,05–25 mg/l) tápanyagforrásként szolgálhat a különböző alga-fajok és biofilmközösségek növekedése során (SAXTON *et al.* 2011, QIU *et al.* 2013, WANG *et al.* 2016). A GLY toxikus hatásait több tanulmányban vizsgálták a különböző biofilmek algaközösségein. A hatóanyag toxicitásában jelentős különbségek figyelhetők meg a különböző víztestek és évek esetében is, ugyanis a toxicitás mértékét jelentős mértékben befolyásolják a természetes vízi élőhelyek specifikus környezeti paraméterei (pl. pH, oldott oxigéntartalom) és a

különböző években tapasztalható eltérő hőmérsékleti jellemzők (DILL *et al.* 2010, GOMES és JUNEAU 2017). Eredményeinkhez hasonlóan Pesce és munkatársai (2009) szintén jelentős különbségeket detektáltak a GLY felszíni vizek mikrobiális perifiton közösségeire gyakorolt szezonális hatásainak értékelése során. A GLY-kezelés hatására a kezelt biofilmek algaközösségeiben szelekciós folyamatokat figyeltünk meg, ugyanis a GLY-terhelés hatására az érzékenyebb fajok eltűntek a biofilmek mikrobiális közösségéből, előidézve a biomassza esetleges csökkenését, amelyet a GLY-kezelés hatásaival szemben toleráns fajok elősorban a GLY hatóanyagot tápanyagforrásként hasznosító fonalas zöldalgafajok gyors növekedése követett (15–16. ábra) (PESCE *et al.* 2009). A talaj-mikroorganizmusok vizsgálata során korábban már bizonyították, hogy a mikrobiális közösségek képesek adaptálódni és tolerálni a GLY hatásait (DICK *et al.* 2010). Eredményeinkhez hasonlóan a Saxton és munkatársai (2011) által elvégzett mezokozmosz-vizsgálatok eredményei is azt mutatják, hogy a GLY hatóanyagnak pozitív és negatív hatásai is lehetnek a felszíni vizek fitoplankton-közösségeinek szerkezetére. A technikai tisztaságú GLY szabad sav jóval magasabb koncentrációban történő (3 mg/l) alkalmazása során a kéalgák arányának növekedését, valamint a zöld- és kovaalgák csökkenését figyelték meg (GONZALEZ *et al.* 2019), továbbá az expozíció kezdetét követő 2. naptól az algaközösség klorofill-a-tartalmának folyamatos növekedését tapasztalták (VERA *et al.* 2014), azonban jóval alacsonyabb koncentrációban 6,9 µg/l nem eredményezett változást a perifiton biomasszájának alakulásában a kontrollcsoportéhoz képest 3–5 hét elteltével sem (RELYEA 2009). Lozano és munkatársai (2018) egy újabb tanulmányban szintén a GLY-IPA hatásait vizsgálták jóval magasabb koncentrációkban (0,3; 3,2; 5; 45 mg/l) a fitoplankton- és perifitonközösségek klorofill-a-tartalmára, ahol a perifitonközösség sokkal toleránsabbnak bizonyult a fitoplanktonhoz képest. Az általuk vizsgált koncentrációk az alkalmazott egyhetes expozíciót követően nem indukálták az algaközösség biomasszájának szignifikáns mértékű változását, habár vizsgálataikat jóval érettebb biofilmeken (60-napos kolonizáció) végezték el, amelyek esetében az összetettebb szerkezet és EPS-mátrixréteg védelmet nyújt a mikroorganizmusok számára a szennyező anyagok kedvezőtlen hatásaival szemben (FLEMMING és WINGENDER 2010). A Shaw és Mibbayad (2016) által elvégzett tanulmányban a GLY-IPA vizsgált legalacsonyabb koncentrációja (342,3 mg/l) is a klorofill-a-tartalom szignifikáns mértékű csökkenését idézte elő, amely koncentráció jóval meghaladja az általunk vizsgált dózist.

Vizsgálataink során a formázott készítmény a kezelt biofilmek algabiomasszájának csökkenését eredményezte két hét elteltével [2015: Balaton, Duna; 2016: Velencei-tó (13–14., 19. ábra)], ez alól kivételt képez a 2016. évi dunai adatsor, azonban ebben az esetben is a biomassza szignifikánsan lassabb növekedése volt megfigyelhető a kontrollcsoportéhoz képest

(18. ábra). A Balaton esetében a csökkenés mértéke szignifikánsan meghaladta a kontrollcsoportban tapasztalt csökkenés ütemét (13. ábra). A biotassza-csökkenés a 2015. évi dunai biofilmek esetében a 4. vizsgálati hétig volt megfigyelhető, amelyet követően a biotassza növekedése volt tapasztalható (14. ábra), ezzel szemben a Balatonból származó biofilmek esetében csak a 10. héten volt tapasztalható a biotassza növekedése (13. ábra), míg a Velencei-tavi minták esetében a kísérlet végén a biotassza stagnálása volt detektálható. Mindezek alapján megállapítható, hogy a Balaton és a Velencei-tó perifitonközösségére ható szelekciós folyamatok jobban elhúzódtak, mint a vizsgált folyóvíz esetében. A jelenség hátterében elsősorban a természetes vizek eltérő pH-értéke állhat ugyanis a Duna és Balaton esetében meghatározott pH-értékek (8,1–8,2) jóval magasabbak, mint a szikes Velencei-tó nyugati területein mérhető 6,9–7,1-es értékek (FOLMAR *et al.* 1979, SERVIZI *et al.* 1987, TSUI és CHU 2003). A formázott készítmény által előidézett biotassza-csökkenés a tiszta hatóanyag és a POEA fokozott együttes toxicitását jelzi a biofilmek algaközösségeinek esetében is, amely jelenség az algalapozódásgátlási tesztekben is megfigyelhető (TSUI és CHU 2003, PEREIRA *et al.* 2009, LIPOK *et al.* 2010). Eredményeinkhez hasonlóan Gonzalez és munkatársai (2019) a GLY szabad sav és két kiszerelt készítmény (ROUNDUP MAX, GLIFOSATO II ATANOR) hatásait vizsgálták, habár jóval magasabb vizsgálati koncentrációban (3 mg/l) hasonló érettségű biofilmek esetében (36-napos kolonizációs periódus), ahol a készítmények toxicitása meghaladta a tiszta hatóanyag toxicitását a zöld- és kovaalgafajok denzitásának vizsgálata során. A formázott készítmény biofilmek algaközösségeire gyakorolt hatásainak vizsgálata során más tanulmányokban jóval magasabb vizsgálati koncentráció (ROUNDUP: 8 mg/l GLY) alkalmazása mellett a perifiton késleltetett kolonizációját eredményezte, továbbá a kontrollmezokozmoszban a biotasszákat jellemző értékek folyamatosan meghaladták a kezelt csoportban meghatározott értékeket, a vizsgálati periódus során (VERA *et al.* 2010), azonban a perifiton biotasszájának csökkenését és szerkezeti változásait figyelték meg már 6 mg/l-es koncentráció esetében is (PÉREZ *et al.* 2007). A kontroll- és kezelt biofilmek esetében szintén a kovaalgák dominanciáját figyelték meg, saját eredményeinkhez hasonlóan (PÉREZ *et al.* 2007, VERA *et al.* 2010), továbbá a formázott GLY-készítmények (VISION, ROUNDUP) esetében a perifitonközösség biotasszájának kontrollcsoportot meghaladó növekedéséről számoltak be a vizsgálati periódus végén a hozzájuk hasonló (97,7 µg/l) és magasabb GLY-koncentráció (3,8 mg/l) esetében is (AUSTIN *et al.* 1991, RELYEA 2005), ami ebben az esetben is a hatóanyag vagy az adalékanyagok tápanyagforrásként történő hasznosításával magyarázható (VAN GINKEL *et al.* 1993, QIU *et al.* 2013, WANG *et al.* 2016).

A POEA esetében a 2016. évi dunai biofilmek algaközösségeinek BM-értékei folyamatos növekedést mutattak az expozíció során (18. ábra). A velencei-tavi biofilmek esetében a kezdeti

csökkenést követően a 4. héttől szintén az algabiomassza fokozatos növekedése volt megfigyelhető (19. ábra). A *POEA* toxicitása a különböző természetes vizekben eltérő képet mutatott, amely elsősorban szintén az eltérő fajösszetétellel és környezeti körülményekkel (pl. pH, hőmérséklet) magyarázható (FOLMAR *et al.* 1979, GOMES és JUNEAU 2017). Az algaszaporodásgátlási vizsgálatokban a *POEA* bizonyult a legtoxikusabb komponensnek, azonban a biofilmek esetében a *POEA* fokozott biomassza-növekedést eredményezett, amely első sorban az *EPS* védelmi funkcióival magyarázható (FLEMMING és WINGENDER 2010). Egy másik anionos detergens, a nátrium-dodecil-szulfát esetében a detergens biodegradációját követően kialakuló degradációs termék jelentős mértékben stimulálta a mikrobák kitapadását a biofilmen belül, amely elősegíti a mikrobiális közösség növekedését (WHITE 1995), továbbá bizonyos *Pseudomonas*-fajok esetében igazolták, hogy képesek egy nem ionos etoxilált hosszú láncú alkilamin (oktadecil-bisz-(2-hidroxi-etil)-amin) detergenst növekedésük során szén- és energiaforrásként hasznosítani (VAN GINKEL *et al.* 1993). A természetes biofilmek baktériumközösségének bizonyos fajai képesek különböző felületaktív anyagok szintetizálására és szekréciójára (AL-TAHHAN *et al.* 2000), továbbá a különböző felületaktív anyagok jelenléte az *EPS*-mátrixban lehetővé teszi olyan tápanyagok, hidrofób szubsztrátok hozzáférhetőségét, amelyeket enélkül nem tudnának felvenni és hasznosítani a mikrobiális konzorcium tagjai, továbbá elősegítik a horizontális exopolimer-transzfert a baktérium- és algasejtek között (OSTERREICHER-RAVID *et al.* 2000, RODRIGUEZ és BISHOP 2008). A velencei-tavi biofilmmintákban a *POEA* által előidézett biomassza-csökkenést a biomassza növekedése váltotta, amely jelenség hátterében szintén a *POEA* szelekciós hatásai állhatnak, továbbá a *POEA* esetében meghatározott DT_{50} érték természetes felszíni vizekben kb. 3–6 hétre tehető (GIESY *et al.* 2000), így a tapasztalt biomassza-növekedés az alacsony kezdeti koncentráció gyors biodegradációjával és ennek köszönhetően a toxikus hatások elmaradásával is magyarázható.

4.4.3. Biofilmek kovaalga-közösségein végzett vizsgálatok eredményei

Az össz fajszámok alapján a Duna 39 fajjal kovaalgákban sokkal gazdagabbnak bizonyult a Balatonnál (18 faj). A vizsgálatok során jelentős mértékben megváltozott a kovaalga-közösség összetétele a vizsgált balatoni és a dunai biofilmekben egyaránt.

A biológiai jelleg-alapú elemzés során a kezdeti fajszámarányok a c1–c4 méretkategóriában nagyon hasonlóak voltak a két vizes élőhelyen (Balaton: c1–c4: 11%, 17%, 33%, 17%; Duna: c1–c4: 10%, 23%, 39%, 18%), ezzel szemben a legnagyobb méretkategóriában majdnem háromszor annyi faj volt megfigyelhető a balatoni mintákban, mint a dunaiakban (c5: Balaton: 28%; Duna: 10%). Az ökológiai *guild*-ek (vagyis adott taxonok azon

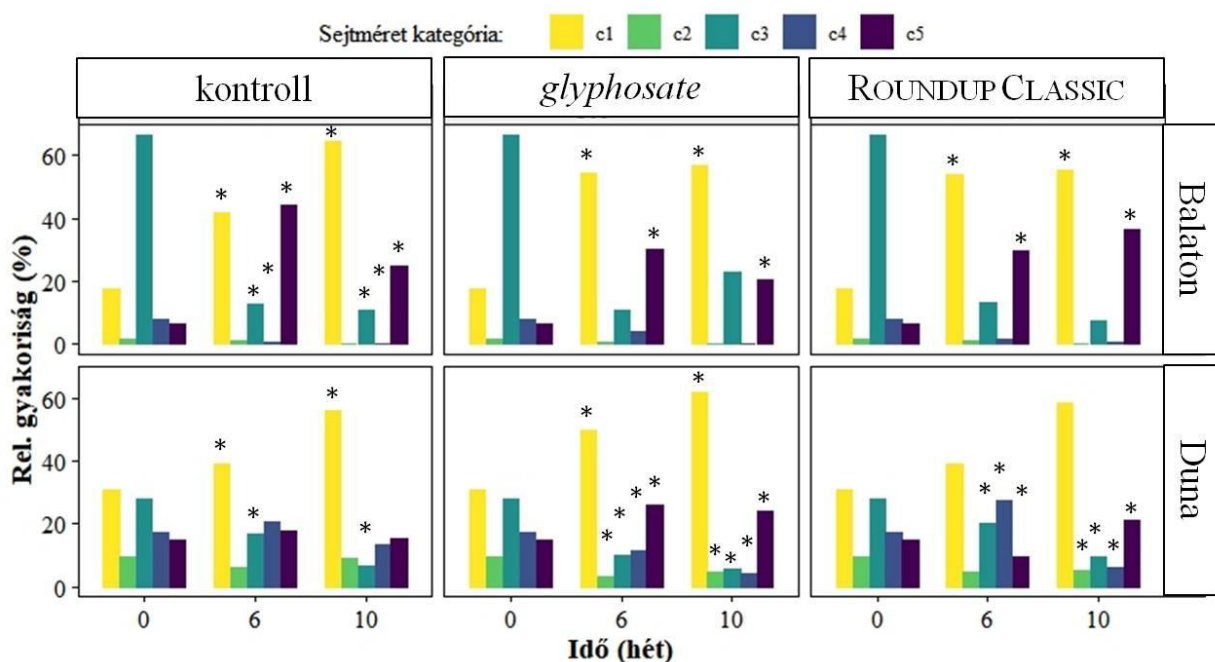
csoportjai, amelyek ugyanabban a környezetben élnek, de ahhoz különböző módon alkalmazkodtak) esetében az expozíciót megelőzően mindkét helyen az alacsony profilú (*LP*) és motilis (*MO*) volt a két legdominánsabb *guild* a fajszámok alapján. A másik két *guild* ezzel szemben erősen alulreprezentált volt, azonban a Dunánál kissé kiegyensúlyozottabb a domináns *guild*-ek aránya (Duna: *LP*: 39%; *MO*: 36%), mint a Balatonban (Balaton: *LP*: 50%; *MO*: 33%). A különbség abból ered, hogy a Dunánál mind a magas profilú (*HP*: 15%), mint a planktonikus (*PL*: 10%) fajok aránya nagyobb volt, a Balatonhoz képest (*HP*: 11%, *PL*: 6%). A vizsgált balatoni és dunai biofilmmintákban a sejtméret szerinti kategóriákban és az ökológiai *guild*-ek esetében sem változtak a fajszámarányok egyik kezelési csoportban sem az idővel ($p > 0,213$).

A kezdeti sejtszámarányok szignifikánsan különböztek a két víztestben, ugyanis amíg a balatoni mintában abszolút uralkodott a c3-as kategória (a sejtek kétharmada tartozott ide, 65%, amelyekből 50% egy fajhoz, a *N. cryptotenella*-hoz tartozott) addig a dunai mintában a c1 és c3 kategóriák hasonló arányban voltak jelen (c1: 31%; c3: 28%), utóbbi a balatoni c3-hoz képest feleakkora relatív gyakoriságot mutatott. A c4 és c5 kategória gyakorisága mindkét helyen hasonló volt (Balaton: kb 8-8%; Duna: 17 és 15%). A c2-es kategória mindkét helyen a legritkább kategória volt, ugyanakkor ezek relatív gyakorisága a dunai mintában sokkal nagyobb volt, mint a balatoniban (Balaton: 1,5%; Duna: 10%).

A sejtszámarány szignifikáns változása volt megfigyelhető az idő előre haladásával minden csoport esetében a balatoni és dunai biofilmmintákban egyaránt. A dunai biofilmekben a c1 erősen, míg a c5 kicsit gyengébben nőtt az idővel, valamint a három középső sejtmérettartomány lecsökkent ($p < 0,001$). A balatoni mintákban a c1 szintén erőteljes növekedése volt megfigyelhető ($p < 0,001$), ezzel szemben a c2 és c4-es sejtkategória mindenhol eltűnt, de ezek eleve ritkák voltak. A dunai minták esetében a középső sejtméret-kategóriák (c2–c4) relatív gyakorisága kiegyenlítődött a kísérlet végére. A változásokat többnyire egy-két domináns faj gyakoriságának megváltozása eredményezte minden csoportban (Balaton: c1: *A. minutissimum*; c3: *N. cryptotenella*, c5: *C. placentula* var. *lineata*; Duna: c1: *A. minutissimum* és *A. pediculus*, c3: *G. parvulum*) (20. ábra).

A kezelések hatásainak statisztikai értékelése alapján a balatoni minták esetében a 6. héten szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a kontroll- és *GLY*-kezelt csoportok között ($p < 0,001$), azonban a két kezelés hatásai között nem volt különbség. Habár minden csoportban megnőtt a c1-es és c5-ös fajok aránya a 6. hétre, a kezeltékben a c1 növekedése erőteljesebb volt a c5-ös fajokkal szemben. A középső méretkategóriák aránya nagyjából megegyezett minden csoportban. A 10. héten a hatóanyag és a formázott készítmény hatásai között szignifikáns különbségek figyelhetők meg ($p < 0,001$). A kontrollban magasabb volt a c1 aránya, mint a két kezelt csoportban. A kezelt csoportok arányaiban leginkább a c1, c3 és c5

kategóriák esetében volt különbség. A dunai mintákban ezzel szemben a 6. héten még minden kezelési csoport különbözött egymástól ($p < 0,047$). A kontrollhoz képest a tiszta hatóanyaggal kezelt csoportban nagyobb volt a c1 és a c5 aránya, míg a középső sejtméret aránya lecsökkent ($p < 0,050$). A formázott készítmény esetében pedig a c5 aránya kisebb, míg a c3–c4 aránya nagyobb volt, mint a kontrollban. A kísérlet végére a tisztahatóanyag esetében a c1 aránya szignifikánsan eltért a kontrolltól, míg c5 aránya mindkét kezelt csoport esetében nagyobb volt, mint a kontrollban ($p < 0,032$). A középső sejtméret aránya ezzel szemben lecsökkent a kezelt csoportokban a kezeletlen egységben tapasztalt értékekhez képest. A két kezelés hatásai között azonban nem volt különbség ($p > 0,053$) (20. ábra).

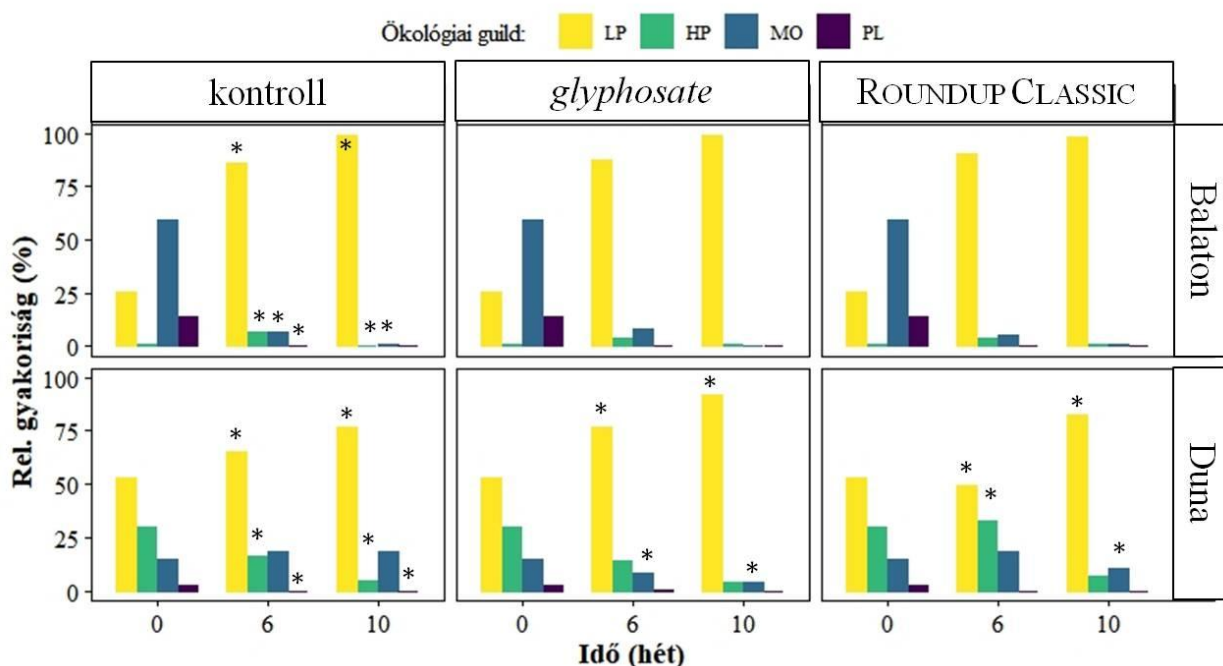


20. ábra A *glyphosate* hatása a 2015. tavaszán a Balatonban és a Dunában természetes körülmények között kialakult biofilmek kovaalga-közösségeinek relatív gyakoriságára a különböző sejtméret-kategóriákban (c1–c5)

A kezdeti sejtszamarányok szignifikánsan különböztek a két helyen az ökológiai *guild*-ek esetében is ($p < 0,023$). A Balatonnál ugyanis erősen eltolt volt az eloszlás a *MO guild* javára (60%, amíg *LP*: 26%, *PL*: 14% és *HP*: 1%), ezzel szemben a Dunánál az *LP* uralkodott már a kísérlet elején is (53%, amíg. *HP*: 30%, *MO*: 15% és *PL*: 3%). A *guild*-ek arányaiból az is látszott, hogy a Dunánál sokkal nagyobb volt a *HP* aránya is, míg az *MO* és *PL* relatív gyakorisága sokkal alacsonyabb volt, mint a Balatonnál (21. ábra).

A sejtszamarány szignifikáns változása volt megfigyelhető az idő előrehaladásával minden csoport esetében a balatoni és dunai biofilmmintákban egyaránt, ugyanis az idő előrehaladásával az *LP* aránya mindkét helyen megnőtt, minden csoportban ($p < 0,001$). Az *LP* kezdetben viszonylag fajgazdag csoport volt, ami a kísérlet folyamán nem változott, azonban a

sejtszámarány-eltolódás szignifikáns mértékű volt, ugyanis a megfigyelt szignifikáns növekedést 2 domináns faj (*A. minutissimum* és *C. placentula* var. *lineata*) elszaporodása eredményezte a balatoni minták esetében. Habár a balatoni mintákban az *MO* hasonlóan fajgazdag csoportként indult, nagy sejtszámmal, minden csoportban erős csökkenés volt tapasztalható, amely első sorban a domináns c3-as *N. cryptotenella* faj lecsökkenésével magyarázható ($p < 0,031$). A *PL* csoport aránya mindkét, míg a *HP* csoport esetében a dunai mintákban volt megfigyelhető erőteljes csökkenés vagy a csoportok teljes eltűnése a vizsgált mintákból ($p < 0,024$) (21. ábra).



21. ábra A *glyphosate* hatása a 2015. tavaszán a Balatonban és a Dunában természetes körülmények között kialakult biofilmek kovaalga-közösségeinek relatív gyakoriságára a különböző *guild*-ekben

A kezelések hatásainak értékelése során csak a Duna esetében tapasztaltunk szignifikáns mértékű hatást. A balatoni minták esetében a 6. héten a kontrollhoz képest a kezelt csoportokban valamivel nagyobb volt az *LP* (K: 86%; G: 88%; R: 91%) és kisebb a *HP* sejtek aránya (K: 7%, G: 4%, R: 4%), de ez a különbség nem szignifikáns ($p = 0,145$). A kísérlet végére a *GLY*-kezelt csoportok még kevésbé tértek el a kontrollcsoporttól, ugyanis minden csoportban az *LP guild*-be tartozott szinte az összes sejt. A dunai biofilmminták esetében a 6. héten mindhárom csoport szignifikánsan eltért egymástól ($p < 0,001$). A *GLY*-kezelt csoportban ugyanis szignifikánsan nagyobb volt az *LP* és kisebb az *MO* aránya, mint a kontrollban, a formázott készítménnyel kezelt mintákban pedig szignifikánsan kisebb lett az *LP* és nagyobb a *HP* aránya, mint a kontrollban ($p < 0,001$). A tiszta hatóanyaggal történő kezelés hatására szignifikánsan nagyobb volt az *LP* és kisebb az *MO* és *HP* aránya, mint a formázott készítmény esetében ($p < 0,001$). Az

expozíció végére a kontrollcsoporthoz képest a tiszta hatóanyaggal történő kezelést követően magasabb lett az *LP* csoport aránya, míg az *MO* esetében az arány lecsökkenése volt megfigyelhető ($p < 0,001$). A formázott készítménnyel kezelt csoportban nagyobb volt az *LP*, míg kisebb az *MO guild*-be tartozó sejtek-aránya ($p < 0,001$) (21. ábra).

A *GLY* és formázott készítményeinek bentikus kovaalga-közösségre gyakorolt hatásait több tanulmányban is vizsgálták (SULLIVAN *et al.* 1981, MAGBANUA *et al.* 2013, WOOD *et al.* 2016). A *GLY* 200 mg/l koncentrációban jelentős hatást gyakorolt a kovaalga-közösség összetételére (WOOD *et al.* 2016). A *GLY* formázott készítményei (GLIFOSATO II ATANOR, ROUNDUP MAX) már 3 mg/l koncentrációban szignifikánsan megnövelték az elpusztult kovaalgasejtek számát a perifitonmátrixban, a technikai tisztaságú *GLY* hatásaihoz képest (GONZALEZ *et al.* 2019).

A sejtméret csökkenése számos tanulmányban megfelelő indikátornak bizonyult nehézfém-szennyezések (JOUX-ARAB *et al.* 2000, CATTANEO *et al.* 2004) és növényvédő szerek esetében is (RIMET és BOUCHEZ 2011). Eredményeink alapján szintén a legkisebb sejtméretű kategória gyakorisága növekedett meg a dunai *GLY*-kezelt csoportokban, azonban esetünkben a legnagyobb sejtméret abundanciája is megnövekedett a kontrollcsoporthoz képest.

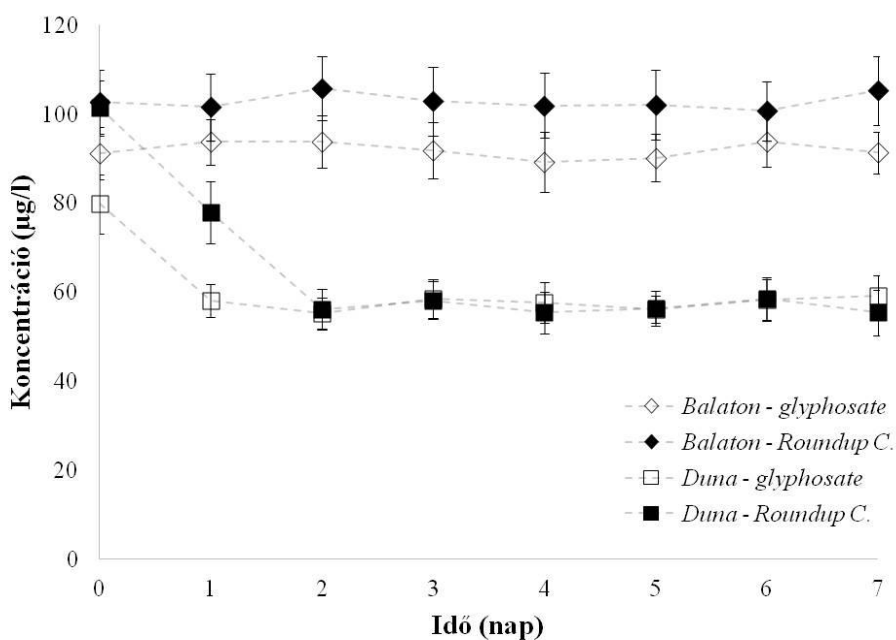
Rimet és Bouchez (2011) mezokozmosz-vizsgálatában a herbicides (*diuron*) és fungicides (*azoxystrobin*, *tebuconazol*) kezelések megnövelték a *MO* és az *LP guild*-ekbe tartozó kovaalgák abundanciáját, míg a *HP* kovaalgafajok esetében csökkenés volt megfigyelhető, ezzel szemben eredményeinkhez hasonlóan Magbanua és munkatársai (2013) éppen ellenkező tendenciát tapasztaltak a *HP guild*-ek esetében a *GLY*-kezelés hatására. Az *LP guild* fajainak (pl. *Cocconeis* és *Encyonema*-fajok) abundanciája többnyire lecsökken a tápanyag- és szervesanyag-koncentráció növekedésével (BERTHON *et al.* 2011), továbbá rezisztensek a turbulens hatásokkal szemben, és képesek a vízben oldott tápanyagok hasznosítására is (PRINGLE 1990, PASSY 2007a, 2007b). A *HP* kovaalgák ezzel szemben általában nagy gyakorisággal fordulnak elő tápanyag gazdag környezetben (PASSY 2007a), amelyet a mi megfigyeléseink is alátámasztanak, ugyanis a *guild* abundanciája jelentős mértékben megnövekedett a formázott *GLY* hatóanyaggal kezelt dunai biofilmekben. A *MO guild* esetében növényvédőszer-szennyezés során bizonyos kovaalgák (pl. *Navicula* és *Nitzschia*-fajok abundanciája növekedést mutat magasabb tápanyag- és szervesanyag-koncentráció esetében (BERTHON *et al.* 2011, RIMET és BOUCHEZ 2011), továbbá rezisztensek bizonyultak bizonyos növényvédő szerek (pl. *atrazine*, *isoproturon*) kezelése hatásával szemben is (GUASCH *et al.* 1998, DORIGO *et al.* 2004), az általunk vizsgált *GLY* kezelt dunai biofilmekben azonban szignifikáns mértékben lecsökkent az *MO* gyakorisága a kontrollcsoporthoz képest. A *PL guild* fajtái minden mintában teljesen eltűntek

a vizsgálat végére kezeléstől függetlenül, amely jelenség feltételezhetően a biofilm mikrobiális szukcessziós és érési folyamataival magyarázható, ugyanis a pionír planktonikus kovaalgák helyét idővel más *guild*-ek fajai veszik át (CARUSO 2019).

4.5. Az analitikai vizsgálatok eredményei

4.5.1. A glyphosate lebomlásának vizsgálata felszínivízmintákban

A GLY lebomlása eltérő képet mutatott tiszta hatóanyag és készítmény formájában, valamint a két természetes víztestben egyaránt. A GLY hozzáadását (100 µg/l GLY-IPA) követően 30 perc elteltével (0. időpont a 21. ábrán) begyűjtött dunai vízmintákban a formázott készítmény esetében (POEA jelenlétében) jóval magasabb koncentrációkat ($101,0 \pm 6,2$ µg/l) mértünk vissza, mint a tiszta hatóanyag esetében ($79,9 \pm 6,6$ µg/l) ($p = 0,016$), majd mindkét esetben $57,6 \pm 1,4$ µg/l tartományban állandósult a hatóanyag-koncentráció (22. ábra).

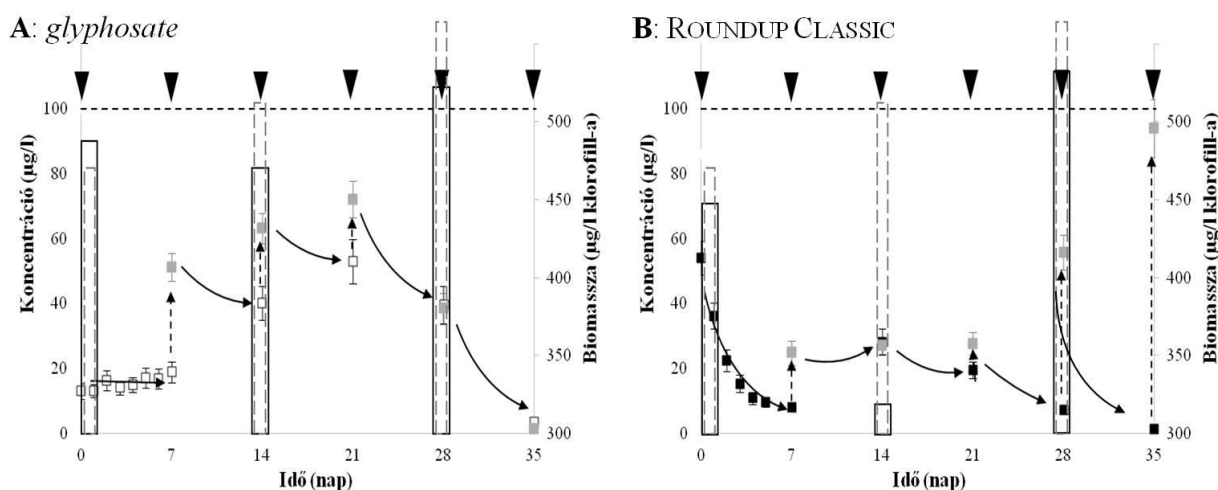


22. ábra A glyphosate lebomlása tiszta hatóanyag formázott készítmény (ROUNDUP CLASSIC) formájában dunai és balatoni vízmintákban

A formázott készítmény esetében azonban a hatóanyag-koncentráció késleltetve, kb. 1 nappal később érte el a konstans értéket. A balatoni vízminták esetében a 30 perc elteltével visszamért GLY-koncentráció a hatóanyag ($91,2 \pm 5,9$ µg/l) és a formázott készítmény ($103,1 \pm 7,2$ µg/l) esetében sem mutatott változást 1 hét alatt, ugyanis a GLY-koncentráció 90 µg/l, valamint 100 µg/l körüli értéken stagnálódott. A formázott készítmény esetében azonban a dunai

vízmintákhoz hasonlóan szintén magasabb koncentrációértékeket határoztunk meg a tiszta hatóanyaghoz képest (22. ábra).

A biofilmek jelenléte jelentősen befolyásolta a *GLY* lebomlását tiszta hatóanyag és formázott készítmény formájában is (23–24. ábra). A dunai vízmintákban a *GLY* hozzáadását követően visszamért hatóanyag-koncentráció a tiszta hatóanyag és formázott készítmény esetében biofilmek jelenlétében $13,0 \pm 2,4 \mu\text{g/l}$ (23/A. ábra) és $54,0 \pm 5,2 \mu\text{g/l}$ (23/B. ábra) volt. A tiszta hatóanyag esetében az első héten $15 \mu\text{g/l}$ érték körül állandósult (23/A. ábra), ezzel szemben a formázott készítmény esetében folyamatos csökkenés volt megfigyelhető, ahol a *GLY*-koncentráció az első hét végére $8,0 \pm 1,3 \mu\text{g/l}$ -re csökkent (23/B. ábra). A tiszta hatóanyaggal történő kezelés az összbiomassza csökkenését eredményezte a kontrollcsoporthoz képest, amely fitotoxikus hatást a *POEA* jelenléte nagymértékben fokozta a formázott készítményben (23. ábra).



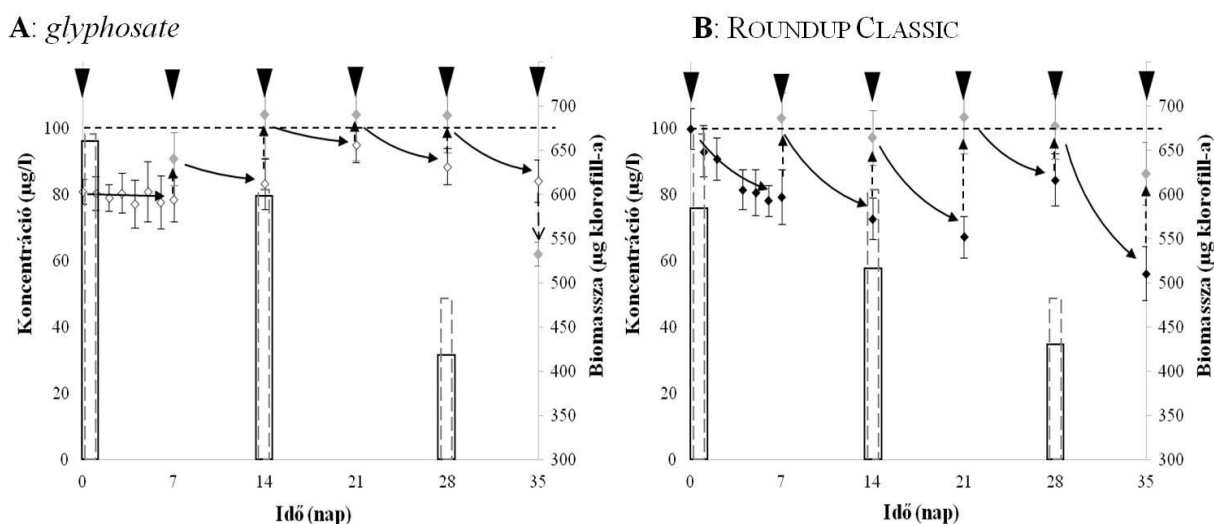
23. ábra A *glyphosate* lebomlása tiszta hatóanyag (A: □) és formázott készítmény (B: ■) formájában, dunai vízmintákban biofilmek jelenlétében*

* Az 1. hét elteltével a heti szintű vízcserék során a *GLY*-koncentráció ($100 \mu\text{g/l}$) ismételt beállítását (▼) követően 30 perc elteltével került sor a mintavételezésre és a *GLY*-koncentráció (■) analitikai meghatározására. Az ábrákon nyilak (folytonos vonalú) jelzik az egy hét alatt megfigyelhető koncentrációváltozást, valamint a vízcseré előtt és után meghatározott *GLY*-koncentrációk között megfigyelhető különbségeket (szaggatott vonalú nyilak), továbbá feltüntetésre kerültek a vizsgálati periódus során meghatározott összbiomassza-értékek a kontroll- (szürke, szaggatott körvonalú oszlopok) és a kezelt (fekete, folytonos körvonalú oszlopok) csoportban egyaránt.

Az 1. hetet követően a heti vízcserék alkalmazása mellett a *GLY*-koncentráció fokozatos növekedése volt megfigyelhető a tiszta hatóanyag esetében a vízcseréket megelőző és a koncentráció ismételt beállítását követő mintavételek alapján. A 4. héten az összbiomassza növekedése volt megfigyelhető, amelyet a *GLY*-koncentráció csökkenése kísért (23/A. ábra). A készítmény esetében azonban az értékek stagnálása ($19,5$ – $28,1 \mu\text{g/l}$) volt megfigyelhető az 1.

hetet követően. A 4. héttől az összbiomassza növekedésével a formázott készítmény esetében is a GLY-koncentráció növekedése volt megfigyelhető a vízcserét követően, azonban a vízcserét megelőzően a koncentráció fokozatos csökkenése tapasztalható (23/B. ábra).

A balatoni biofilmek esetében a kontroll- és kezelt csoportokban egyaránt a biomassza fokozatos csökkenése volt megfigyelhető, azonban a csökkenés mértéke jelentősebb volt a kezelt biofilmek esetében, főleg POEA jelenlétében (24. ábra). A balatoni vízmintákban a GLY hozzáadását követően visszamért hatóanyag-koncentráció a tiszta hatóanyag és formázott készítmény esetében biofilmek jelenlétében $81,0 \pm 3,7 \mu\text{g/l}$ (24/A. ábra) és $100,2 \pm 6,2 \mu\text{g/l}$ (24/B. ábra) volt. A tiszta hatóanyag esetében az első héten a GLY-koncentráció $80 \mu\text{g/l}$ érték körül állandósult (24/A. ábra), ezzel szemben a formázott készítmény esetében folyamatos csökkenés volt megfigyelhető a balatoni vízmintákban is, ahol a GLY-koncentráció az első hét végére $79,5 \pm 8,3 \mu\text{g/l}$ -re csökkent (24/B. ábra).



24. ábra A *glyphosate* lebomlása tiszta hatóanyag (A: ◇) és formázott készítmény (B: ◆) formájában, balatoni vízmintákban biofilmek jelenlétében*

* Az 1. hét elteltével a heti szintű vízcserék során a GLY-koncentráció ($100 \mu\text{g/l}$) ismételt beállítását (▼) követően 30 perc elteltével került sor a mintavételezésre és a GLY-koncentráció (◆) analitikai meghatározására. Az ábrákon nyilak (folytonos vonalú) jelzik az egy hét alatt megfigyelhető koncentrációváltozást, valamint a vízcseré előtt és után meghatározott GLY-koncentrációk között megfigyelhető különbségeket (szaggatott vonalú nyilak), továbbá feltüntetésre kerültek a vizsgálati periódus során meghatározott összbiomassza-értékek a kontroll- (szürke, szaggatott körvonalú oszlopok) és a kezelt (fekete, folytonos körvonalú oszlopok) csoportban egyaránt.

Az 1. hetet követően a heti vízcserék alkalmazása mellett a GLY-koncentráció nem változott jelentős mértékben a tiszta hatóanyag esetében, azonban az ötödik héten a GLY-koncentráció ismételt beállítását követően 30 perc elteltével a hatóanyag-koncentráció kis mértékben lecsökkent ($62,3 \pm 3,7 \mu\text{g/l}$) (24/A. ábra). A formázott készítmény esetében a 4. hétig a

vízcseréket követően a beállított *GLY*-koncentráció teljes mennyiségben visszamérhető volt a begyűjtött vízmintákban, az 5. héten elvégzett mintavétel során azonban a tiszta hatóanyaghoz hasonlóan a koncentráció csökkenése volt megfigyelhető (24/B. ábra).

A vizsgált természetes vizekben igen nagy különbségek voltak megfigyelhetőek a *GLY* lebomlásának vizsgálata során, ugyanis a dunai vízmintákban a hatóanyag-koncentráció kezdeti csökkenése után, a *GLY*-koncentráció állandó tartományban megfigyelhető stagnálása volt tapasztalható mindkét vizsgált forma esetében, ezzel szemben a balatoni vízminták esetében nem tapasztaltunk változást a visszamért *GLY*-koncentráció alakulásában az egyhetes vizsgálati periódus során (22. ábra). A *GLY* esetében elérhető felezési idők igen nagy variabilitást mutatnak a felszíni vizekben. A *GLY* DT_{50} -értéke vizes közegben pár naptól egészen 301 napig terjedhet, míg fotodegradációját természetes vizekben 33–77 nap, továbbá laboratóriumi körülmények között üledék jelenlétében tapasztalható degradációját 27–146 nap közötti DT_{50} -értékekkel jellemezték, amely szerint a molekula besorolása a perzisztencia alapján középestől magasnak tekinthető (EFSA 2015, MACBEAN 2012). A különböző tanulmányokban a *GLY* degradációját jellemző DT_{50} -értékek 1,5–70 nap között alakultak (RUEPPEL *et al.* 1977, GHASSEMI *et al.* 1981, GOLDSBOROUGH és BECK 1989, VERA *et al.* 2010). A szakirodalmi adatok és saját eredményeink alapján látható, hogy a *GLY* környezeti sorsa és koncentrációjának alakulása a felszíni vizekben nagyfokú helyspecifikusságot mutat, továbbá nagymértékben függ a különböző természetes vizek fizikai (pl. vízáramlás, hőmérséklet, üledék jelenléte, lebegő szilárd részecskék) és kémiai (pl. pH, oldott oxigéntartalom, vízkeménység, foszfortartalom, kationok koncentrációja) jellemzőitől, továbbá a mikrobiális közösség összetételétől (pl. biodegradáció) (GOLDSBOROUGH és BROWN 1993, SVIRIDOV *et al.* 2015, FERNANDES *et al.* 2019).

Eredményeink igazolják, hogy a *GLY* koncentrációját vizes közegben jelentős mértékben befolyásolja a *POEA* jelenléte. A választott *GLY*-koncentráció beállítását követően 30 perc elteltével begyűjtött mintákban a formázott készítmény esetében jóval magasabb koncentrációkat határoztunk meg a tiszta hatóanyaghoz képest a vizsgált dunai és balatoni vízmintákban, biofilmek jelenlétében is (22–24. ábra). A tapasztalt jelenség feltételezhetően azzal magyarázható, hogy a felületaktív anyag módosítja a *GLY* adszorpciós képességét, ezzel csökkentve a *GLY* fizikai adszorpciójának mértékét a szilárd–folyadék-határfázisok felületén (pl. az akváriumok üvegfelületei, szilárd fázisok és lebegő részecskék a vízmintákban) (BERGSTRÖM *et al.* 2011, LI *et al.* 2016), továbbá a növényvédőszer-hatóanyagokhoz hozzáadott felületaktív anyagok micellákat képeznek, amelyek elősegítik a *GLY* oldatban maradását, továbbá védelmet nyújtanak a degradációval szemben (RODRIGUEZ-GIL *et al.* 2017, MESNAGE és ANTONIOU 2018).

A *GLY* lebomlását a *POEA* mellett a biofilmek jelenléte is jelentős mértékben befolyásolta (23–24. ábra). Az alkalmazott *GLY*-koncentráció beállítását követően a dunai vízmintákban jóval alacsonyabb értékek voltak visszamérhetőek biofilmek jelenlétében (23. ábra), amely elsősorban a hatóanyag biodegradációjával, a biofilm mikrobiális közösségei által termelődő *EPS* adszorpciós kapacitásával, továbbá a hatóanyag akkumulációjával lehet magyarázható (SCHORER és EISELE 1997, SPATH *et al.* 1998, LAWRENCE *et al.* 2001). A balatoni vízmintákban 30 perc elteltével biofilmek jelenlétében is magas kezdeti értékek voltak visszamérhetőek (24. ábra), amely feltételezhetően a biofilmek mikrobiológiai összetételben, és a vízkémiai jellemzők esetében megfigyelhető különbségekkel magyarázható (GOLDSBOROUGH és BROWN 1993, TSUI és CHU 2003). A biofilmek adszorpciós kapacitását jelentős mértékben meghatározza a mikrobiológiai közösség, az *EPS* összetétele (pl. karboxil- és hidroxil-csoportok mennyisége) és a már adszorbeált anyag mennyisége (SCHORER és EISELE 1997). A *GLY* akkumulációját és biodegradációját biofilmek jelenlétében több tanulmányban igazolták (GIESY *et al.* 2000, CARLES *et al.* 2019, FERNANDES *et al.* 2019).

A tiszta hatóanyag vizsgálata során, az első héten szintén a *GLY*-koncentráció stagnálása volt megfigyelhető biofilmek jelenlétében is mindkét vízminta esetében (23/A. és 24/A. ábra), de jóval alacsonyabb koncentrációban, mint az biofilmek jelenléte nélkül volt tapasztalható, amely ebben az esetben elsősorban a biofilmek adszorpciós kapacitásával magyarázható. A dunai vízmintákban a formázott készítmény esetében megfigyelhető koncentrációcsökkenés biofilmek jelenlétében jóval fokozatosabb (23/B. ábra), továbbá a balatoni vízmintákban is tapasztalhatóvá vált a koncentráció fokozatos csökkenése (24/B. ábra), hasonlóan a Vera és munkatársai (2010) által publikált felszínivízmintákban elvégzett lebomlási vizsgálat eredményeihez.

A dunai vízmintákban az 1. hetet követően, a tiszta hatóanyag esetében a biofilmek laboratóriumi fenntartásának érdekében elvégzett heti szintű vízcserék mellett a hatóanyag-koncentráció a vízcserét megelőzően, továbbá a koncentráció ismételt beállítását követően is folyamatos növekedést mutatott a hatóanyag koncentrációja a vizsgált vízmintákban (23/A. ábra), amely a biofilmek és az *EPS* által nyújtott szorpciós helyek folyamatos telítődésére utal, így egyre nagyobbá vált a vízmintákból visszamérhető *GLY*-mennyiség. A 4. héten tapasztalt biomassza-növekedés és fokozott *EPS*-termelés új kötőhelyekkel szolgálhat, továbbá a *GLY* hatásaival szemben toleráns alga-, baktérium- és gombafajok tápanyagként hasznosíthatják a vízben oldott és az *EPS*-mátrixba bekerülő *GLY* hatóanyagot (SAXTON *et al.* 2011, HOVE-JENSEN *et al.* 2014, SVIRIDOV *et al.* 2015), amely tényezők magyarázhatják a *GLY*-koncentráció lecsökkenését a vízcserét követően (23/A. ábra). A formázott készítmény esetében a kezdeti csökkenést követően a koncentráció nem változott jelentős mértékben az alkalmazott

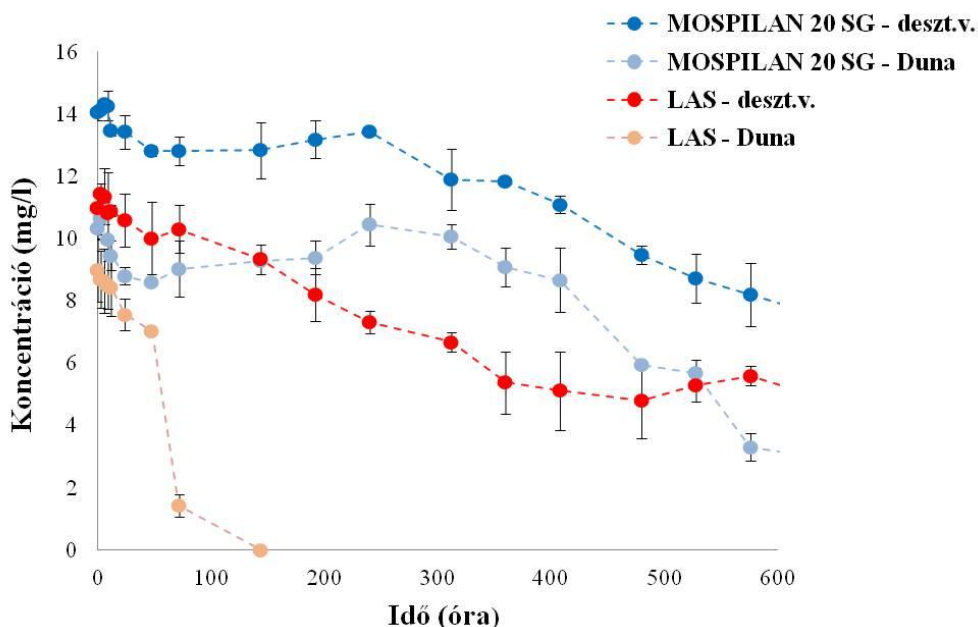
vízcserek során a 4. hétig, ahol növekedés volt megfigyelhető a vízcseret követően, amely feltételezhetően szintén a kötőhelyek telítődésével magyarázható, azonban hétről hétre a *GLY*-koncentráció csökkenése volt megfigyelhető a vízcsere előtt begyűjtött mintákban, amely ebben az esetben is a toleráns fajok tápanyag-hasznosításával és a hatóanyag adszorpciójával magyarázható (23/B. ábra). A formázott készítmény esetében a kötőhelyek késleltetett telítődését elsősorban a *POEA* jelenlétében megfigyelhető micellaképződés és a növényi sejtfal integritásának megemelkedése eredményezi, ugyanis a *POEA* poláris része micellát képez a *GLY* hatóanyaggal, amelyet követően az apoláris részeken keresztül kötődik be az *EPS*-mátrixba, továbbá a sejtfal integritásának emelkedése elősegíti a *GLY* felvételét a növényi sejtekben (FRANZ 1985, MESNAGE és ANTONIOU 2018).

Az 1. hetet követően a balatoni vízmintákban a hatóanyag-koncentráció alakulása a dunai víminták esetében tapasztalt tendenciákhoz hasonlóan alakult, azonban itt a biofilmek jelenlétében is jóval kisebb mértékű koncentrációcsökkenés volt megfigyelhető. A vízcsereket megelőzően, és a *GLY*-koncentráció beállítását követően begyűjtött vízmintákban a hatóanyag-koncentráció nem változott egészen a vizsgálat 5. hetéig, ahol a koncentráció csökkenése volt megfigyelhető a tiszta hatóanyag és formázott készítménye esetében egyaránt (24. ábra). A visszamérhető hatóanyag-koncentráció csökkenése elsősorban a stresszhatások (pl. a laboratóriumi körülmények között megváltozott környezeti körülmények, *GLY*-kezelés, *POEA* jelenléte) által indukált fokozott *EPS*-termeléssel és a megnövekedett *EPS* adszorpciók kapacitásával magyarázható (DOMOZYCH 2007, FLEMMING és WINGENDER 2010).

4.5.2. *A lineáris alkil-benzol-szulfonátok (LAS) lebomlásának vizsgálata vizes közegben*

A *LAS*-lebomlász vizsgálata során jelentős különbséget tapasztaltunk a két vizsgált víztípus esetében. A meghatározott DT_{50} -értékek a Dunából származó felszínivízmintákban a detergenskeverék esetében $58,7 \pm 2,0$ óra, míg a készítmény esetében az aktív hatóanyag és egyéb adalékok jelenlétében $495,0 \pm 32,0$ óra. A desztillált vizes mintákban ezzel szemben a detergenskeverék és készítmény esetében számított értékek $215,2 \pm 18,0$ óra és $519,0 \pm 32,0$ óra. A *LAS* lebomlási üteme tiszta detergenskeverék formájában szignifikáns mértékben meghaladta a MOSPILAN 20 SG formájában tapasztalt lebomlás mértékét a desztillált vizes és dunai vízmintákban egyaránt ($p < 0,001$). A leggyorsabb lebomlási ütemet a detergenskeverék felszíni vízben történő vizsgálata során tapasztaltuk, ugyanis a *LAS* jelenléte a 144. órától nem volt kimutatható a vizsgált vízmintákban. A vizsgálat kezdetén beállított koncentráció (14,4 mg/l *LAS*) a felszínivízmintákban kissé alacsonyabb értékre csökkent le az első mintavétel alapján (*LAS*: $9,0 \pm 1,0$ mg/l, MOSPILAN 20 SG: $10,3 \pm 0,4$ mg/l), mint a desztillált vizes mintákban (*LAS*:

11,0±0,5 mg/l, MOSPILAN 20 SG: 14,1±0,3 mg/l) (25. ábra). A detergenskeverék lebomlását jellemző DT₅₀-értékek jóval alacsonyabbak a természetes vízminta, mint a desztillált víz esetében ($p < 0,001$), ezzel szemben a MOSPILAN 20 SG esetében meghatározott DT₅₀-értékek esetében nem tapasztalható szignifikáns különbség ($p = 0,410$).

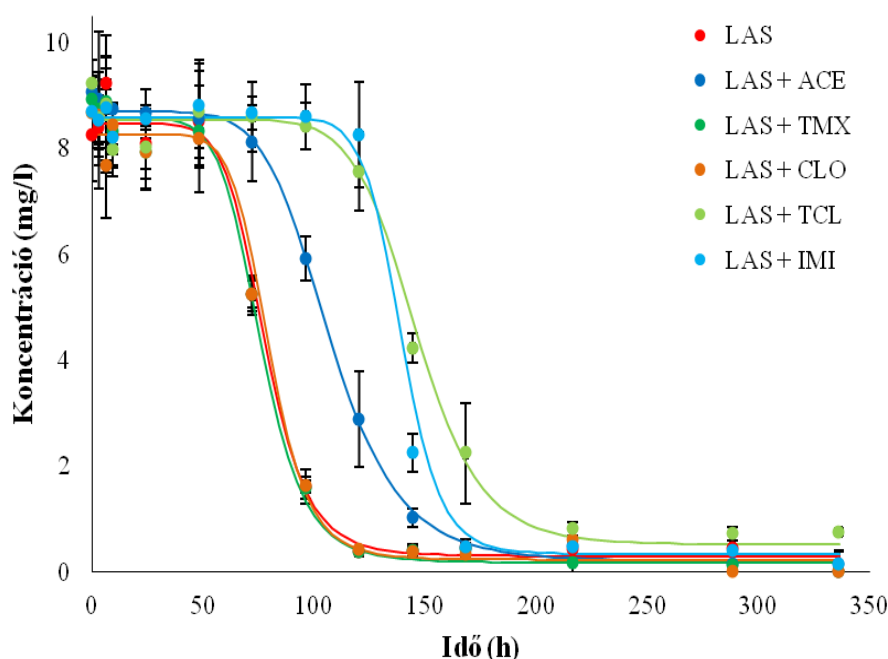


25. ábra A lineáris alkil-benzol-szulfonátok lebomlása detergenskeverék (LAS) és formázott készítmény formájában (MOSPILAN 20 SG) desztillált vízben és dunai vízmintákban.

Vizsgálataink alapján bizonyos neonikotinoid-típusú hatóanyagok jelenléte a Dunából származó felszínivízmintákban jelentősen befolyásolta a DT₅₀-értékek alakulását. A LAS esetében meghatározott DT₅₀-érték 77,4±13,5 óra volt (26. ábra). A TMX és CLO hatóanyagok jelenléte nem befolyásolta szignifikáns mértékben a formázóanyag lebomlását jellemző DT₅₀-értékek alakulását [TMX: 75,5±11,0 óra ($p = 0,809$), CLO: 79,4±12,3 óra ($p = 0,799$)]. Az ACE, IMI és TCL hatóanyagok ezzel szemben szignifikáns mértékben megnövelték a LAS felezési idejét [ACE: 107,0±4,0 óra ($p = 0,002$), IMI: 139,0±6,0 óra ($p < 0,001$), TCL: 146,0±5,0 óra ($p < 0,001$)]. Az utóbbi két hatóanyag esetében a meghatározott érték közel a duplájára emelkedett a LAS egyedi vizsgálata során meghatározott értékhez képest (26. ábra). A vizsgált hatóanyagok esetében nem tapasztaltuk a beállított kiindulási koncentrációk jelentős mértékű csökkenését, habár egy enyhe csökkenés (-15,1%) megfigyelhető volt a TMX esetében.

Eredményeink alapján a LAS lebomlását jelentős mértékben befolyásolják a vizes közeg fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai, de a lebomlás ütemét a neonikotinoid-típusú hatóanyagok (ACE, IMI, TCL) és a készítmények adalékanyagainak jelenléte is befolyásolhatja (25–26. ábra). A LAS a természetes felszínivízmintákban detergenskeverék formában gyorsabb

lebomlást mutatott, mint a desztillált vizes mintákban ($p < 0,001$), ami a természetes vizekben jellemző mikrobiológiai aktivitásnak köszönhető (FEDERLE és VENTULLO 1990, BELANGER *et al.* 2002). A biodegradáció mellett a LAS-homológok felszíni vizekben megtalálható lebegő szilárd részecskék nagyobb méretű frakciójához történő adszorpciója is befolyásolhatja a LAS környezeti koncentrációjának alakulását (GONZÁLEZ-MAZO *et al.* 1997, SAKAI *et al.* 2017), azonban anoxikus és anaerob körülmények között a LAS degradációja nagyon lassú, továbbá akkumulációja is megfigyelhető (TABOR és BARBER 1996). A különböző tanulmányokban a LAS esetében meghatározott felezési idők 10 óra és 16,3 nap között alakultak felszíni vizek esetében, amely értéktartományba beleesnek az esetünkben meghatározott értékek. A LAS degradációját azonban számos tényező befolyásolja (pl. hőmérséklet, pH, a mikrobiális közösség összetétele, a LAS kezdeti koncentrációja), amellyel magyarázhatók a felezési idők esetében megfigyelhető jelentős mértékű különbségek (TAKADA *et al.* 1994, WANG *et al.* 2010).



26. ábra A lineáris alkil-benzol-szulfonátok (LAS) lebomlása detergenskeverék formájában dunai felszínivízmintákban különböző neonikotinoid-típusú hatóanyagok [acetamiprid (ACE), thiametoxam (TMX), clothianidin (CLO), thiacloprid (TCL), imidacloprid (IMI)] jelenlétében

A felszínivízmintákban a mesterségesen hozzáadott formázóanyag koncentrációja kisebb mértékben volt visszamérhető, mint a desztillált vizes mintákban. A dunai vízminták esetében tapasztalt alacsonyabb kezdeti koncentrációk valószínűleg a szűretlen természetes vízben jelenlévő lebegő szilárd részecskék jelenlétével magyarázhatók, ugyanis a felületaktív anyag képes hozzákötődni a kolloid szemcsék felületéhez, az egyensúlyi állapot eléréséig.

A *LAS* lebomlási üteme tiszta detergenskeverék formájában jóval meghaladta a MOSPILAN 20 SG formájában az *ACE* és a formázott készítményekben megtalálható egyéb adalékanyagok jelenlétében tapasztalt lebomlás mértékét ($p < 0,001$). A készítmény biztonsági adatlapja alapján a MOSPILAN 20 SG az *ACE* és a *LAS* mellett kb. 77,4%-ban tartalmaz egyéb adalékanyagokat (SUMI AGRO HUNGARY 2014). Ezek feltételezhetően olyan adalékok, amelyek csökkentik a növényvédőszer-mátrix szétesését, ezzel elnyújtva a hatás kifejtését. A hatóanyag toxicitása is befolyásolhatja a *LAS*-koncentráció alakulását, ugyanis toxikus hatást gyakorolhat a mikroorganizmusokra, ezzel a biodegradáció mértékének csökkenését idézve elő a felszíni vizekben. A *LAS* felezési ideje anaerob, nem tengeri üledékekben mintegy 90 napra tehető, míg aerob körülmények között a felezési idők 1–4 nap között alakultak, azonban, ha a szulfátredukáló és metanogén baktériumok mikrobiális aktivitása gátlódik, a DT_{50} -értékek megnövekednek és akár a több évet is elérhetik (LARA-MARTÍN *et al.* 2007).

A *CLO*, *IMI* és *TMX* ($DT_{50} = 40,3; 30; 30,6$ nap) hatóanyagok stabilnak tekinthetők a vizes fázisban, míg az *ACE* és a *TCL* ($DT_{50} = 4,7; 8,5$ nap) lebomlása mérsékelten gyors (PPDB 2020). A *Pesticide Manual* kézikönyvben megtalálható adatok alapján a *TMX* felezési ideje természetes vizekben 7,9–39,5 nap között alakul, míg az *IMI* esetében a hatóanyag gyors lebomlása tapasztalható vizes oldatának vizsgálata során, a direkt fotolízis eredményeként ($DT_{50} =$ kb. 4 óra), az *ACE*, *CLO*, és *TCL* hatóanyagok esetében nem található felszíni vizekre vonatkozó felezési érték (MACBEAN 2012). Saját eredményeink alapján a hatóanyagok 2 héten keresztül stabilnak bizonyultak a vizsgált felszíni víz esetében, azonban az *ACE*, *IMI* és *TCL* hatóanyagok jelentős mértékben lelassították a *LAS* felszíni vizekben történő lebomlását.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A humán- és állatgyógyászatban alkalmazott SUMETROLIM készítmény és két hatóanyagának a *sulfamethoxazole* és *trimethoprim* (*TRI*) készítményben feltüntetett koncentrációkkal ekvivalens keverékének vizsgálata során *Daphnia magna* tesztszervezeten megállapítottam, hogy a *TRI* egyedi akut toxicitása közel tízszer alacsonyabb, mint a vizsgált tiszta hatóanyag-keverékben kialakuló együttes toxicitása, valamint a glutation-S-transzferáz (GST) enzimaktivitás növekedését igazoltam a vizsgált hatóanyagok és készítmény esetében.
2. A neonikotinoid-készítmények *D. magna* immobilizációjára gyakorolt akut toxicitásának vizsgálata során elsőként bizonyítottam, hogy a *clothianidin*-tartalmú APACHE 50 WG és az *acetamiprid* (*ACE*)- tartalmú MOSPILAN 20 SG készítményekben megtalálható adalék- és hatóanyagok együttes toxicitása meghaladja a hatóanyagok önálló toxicitását.
3. Az *ACE* és a formázóanyagként alkalmazott lineáris alkil-benzol-szulfonátok (*LAS*) MOSPILAN 20 SG készítményben feltüntetett koncentrációkkal ekvivalens keverékének vizsgálata során erős szinergens hatást igazoltam *D. magna* tesztszervezeten, a készítmény esetében, azonban a kombinált hatás csökkenését figyeltem meg. Az *ACE* egyedi (65 mg/l), valamint a formázóanyaggal együttes keverékének (7,4 mg/l *ACE* és 0,9 mg/l *LAS*) expozíciója során a GST-enzimaktivitás csökkenését igazoltam. Emellett bizonyítottam, hogy a *LAS* lebomlását jelentős mértékben befolyásolják a vizes közeg fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai, de a lebomlás ütemét a neonikotinoid-típusú hatóanyagok jelenléte is befolyásolhatja. Az *ACE*, *imidacloprid* és *thiacloprid* hatóanyagok szignifikáns mértékben megnövelik a *LAS* felezési idejét.
4. A *glyphosate* (*GLY*)- tartalmú ROUNDUP CLASSIC készítmény és összetevőinek fitotoxicitásának vizsgálata során hormetikus hatást mutattam ki a *Pseudokirchneriella subcapitata* algafaj fotoszintetikus aktivitására. A polietoxilált faggyúaminok keverékének (*POEA*) (19,2 mg/l) és a formázott készítmény (11,6–50,6 *GLY*) magasabb vizsgálati koncentrációi a fotoszintetikus aktivitás csökkenését idézték elő.
5. Elsőként mutattam ki, hogy a ROUNDUP CLASSIC készítmény és összetevői (*GLY*: 100 µg/l; *POEA*: 37,4 µg/l) már a szakirodalomban fellelhető koncentrációknál jóval alacsonyabb koncentrációban is hatást gyakorolnak a hazai felszíni vízi biofilmek algaközösségeinek biomasszájára és összetételére, amely hatások helyspecifikusak. A

hazai felszíni vízi biofilmek kovaalgaközösségeinek biológiai jelleg-alapú vizsgálata során bizonyítottam, hogy a *GLY* és formázott készítménye hatást gyakorol a kovaalgák relatív gyakoriságára a különböző sejtméret- és ökológiai *guild*-kategóriákban.

6. Kimutattuk, hogy a *GLY* lebomlása igen eltérő képet mutat a vizsgált hazai felszíni vizekben. Vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a *POEA*, valamint a biofilmek jelenléte befolyásolja a *GLY* környezeti koncentrációjának alakulását.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A vizsgált állatgyógyászati és neonikotinoid-típusú hatóanyagok akut hatásainak vizsgálata során jelentős különbségek figyelhetők meg a hatóanyagtípusokon belül megfigyelhető hasonló kémiai szerkezet ellenére. Eredményeink és a szakirodalmi adatok alapján kijelenthető, hogy a különböző szulfonamid-típusú és a *trimethoprim* (*TRI*) hatóanyagok toxicitása jelentős mértékben függ az alapszerkezethez kapcsolódó funkcionális csoportok és szubsztituensek jellegétől, továbbá a különböző környezeti paraméterektől (pl. a vizes közeg pH-értéke, fotodegradáció mértéke, UV-sugárzás) (ABELLÁN *et al.* 2007, JUNG *et al.* 2008, ANSKJAER *et al.* 2013). A hasonló szerkezet ellenére megfigyelhető jelentős különbségek a vizsgált hatóanyagok egyedi toxicitásában arra figyelmeztetnek, hogy a közös szerkezeti elemek/hasonló szerkezet alapján történő toxikus hatások becslése során alkalmazott extrapolációk végrehajtása során (pl. QSAR modellezés) igen körültekintően kell eljárni. A *sulfamethoxazole* (*SMX*) és a *TRI* állatgyógyászati hatóanyagok vizsgálata alapján látható, hogy az akut immobilizációs tesztekben a kezelések hatásai között nem tapasztaltunk különbséget, ezzel szemben a hatóanyagok glutation-S-transzferáz enzimaktivitásra gyakorolt hatásai között szignifikáns mértékű eltérés volt megfigyelhető. Az állatgyógyászati és növényvédőszerkészítmények engedélyezési folyamatában a kötelezően előírt standard vizsgálatok körét szükséges lenne a sokkal érzékenyebb vizsgálati módszerek és végpontok (pl. enzimaktivitásvizsgálatok, immunmodulációs hatás) alkalmazásával kibővíteni, főleg, amikor a vizsgált anyagok hatásmechanizmusának feltérképezése a cél.

A vizsgált algafajok érzékenységeiben számos esetben szignifikáns különbségeket tapasztaltunk, többek között még az azonos családba (*Scenedesmaceae*) tartozó *Desmodesmus subspicatus* és *Scenedesmus obtusiusculus* fajok esetében is. A különböző algafajok között tapasztalt érzékenységbeli különbséget több tanulmányban is megfigyelték (TSUI és CHU 2003, ARUNAKUMARA *et al.* 2013, WANG *et al.* 2016), amely eltéréseket feltételezhetően a különböző algasejtek morfológiájában, sejtbiológiájában és fiziológiájában megfigyelhető különbségek eredményezik. A standard vizsgálatok eredményeiben tapasztalható jelentős mértékű variabilitás miatt a környezeti kockázatbecslés során lehetőség szerint érdemes adott taxon több képviselőjén is elvégezni az ökotoxikológiai vizsgálatokat, ahol a vizsgálatba vont fajok kiválasztása történhet többek között az ökológiai relevancia és elterjedés vagy a fajok érzékenysége alapján. A fitotoxikus hatások értékelése során a fotoszintetikus aktivitás mérése lehetővé teszi a toxikus hatások kialakulásának gyors jelzését, amelyet a sejtek károsítása nélkül valósíthatunk meg.

Bár az általunk meghatározott egyedi toxicitási értékek meghaladják a felszíni vizekben átlagosan $\mu\text{g/l}$ nagyságrendben kimutatható szulfonamidok, *TRI* és neonikotinoid-típusú hatóanyagok környezeti koncentrációit (ANDERSON *et al.* 2015, SCHAAFSMA *et al.* 2015, SZÉKÁCS *et al.* 2015), a környezeti kockázatbecslést mindenképpen el kell végezni esetükben is, ugyanis a felszíni vizekben megjelenő szermaradékok toxicitását jelentős mértékben befolyásolhatják az élőhely specifikus környezeti körülmények. Bizonyos specifikus pontforrások esetében (pl. gyógyszergyárak szennyvízkezelését követően, akvakultúrák gyógyszeres kezelését követően) a szennyezettségi értékek azonban elérhetik akár a mg/l -es nagyságrendet is (LARSSON *et al.* 2007). A vizsgált hatóanyagok viszonylag kis koncentrációban, de folyamatosan jelen vannak a felszíni vizekben, ezért a hosszú távú krónikus kitétség hatásainak vizsgálata elengedhetetlen a környezeti kockázatbecslés folyamatában. A neonikotinoid-típusú hatóanyagok esetében pedig már bizonyítottá vált a más növényvédőszer-hatóanyagokkal (pl. az ergoszterol bioszintézisét gátló fungicidek), antibiotikumokkal, valamint különböző formázóanyagok együttes jelenlétében kialakuló szinergens hatások kialakulásának lehetősége a szennyezett felszíni vizekben (SCHMUCK *et al.* 2003, CHEN *et al.* 2010).

A *GLY*-tartalmú készítmények és összetevőik esetében meghatározott toxicitási értékek is jóval a környezeti mintákban meghatározott szennyezettségi szintek alatt maradnak (EDWARDS *et al.* 1980, COUPE *et al.* 2012), azonban a kezelt területek melletti vízfolyásokban, nagyobb esőzéseket követően igen jelentős mértékben megemelkedhetnek a környezeti koncentrációk, továbbá a *GLY* hatóanyag és a *POEA* (polietoxilált faggyúaminok keveréke) toxicitását szintén jelentős mértékben befolyásolhatják a különböző környezeti körülmények (pl. pH, oldott oxigéntartalom, hőmérséklet) (SERVIZI *et al.* 1987, MENSINK és JANSSEN 1994). A globális klímaváltozás eredményeként kialakuló hőmérséklet-emelkedés és a beeső fény intenzitásváltozása így jelentős mértékben befolyásolhatják a *GLY* hatóanyag fitoplankton- és perifiton-közösségekre gyakorolt fitotoxikus hatásait (GOMES és JUNEAU 2017).

A különböző vegyi anyagok toxicitásának meghatározására irányuló vizsgálatok többnyire egy vizsgálati anyag, egy fajra gyakorolt hatásainak meghatározására irányulnak, azonban a különböző vegyületek soha nem egyedileg, hanem több vegyület együttes jelenlétében eredményezik a környezeti elemek szennyezéseit, így a környezeti kockázatbecslés folyamatában kiemelt jelentőségű a keverékhatások vizsgálata. A különböző állatgyógyászati és növényvédő szerek esetében a kombinált toxikus hatások vizsgálata megvalósulhat két vagy akár több hatóanyag egyidejű vizsgálata során, továbbá a hatóanyagok és a formázott készítményben megtalálható adalékanyagok (pl. formázóanyag) együttes vizsgálata során.

A tudományos bizonyítékok és saját eredményeink alapján látható, hogy jelentős különbségek figyelhetők meg az állatgyógyászati és növényvédőszer-készítmények

összetevőinek egyedi és kombinált toxicitásában. Az adalékanyagok összetételében jelentős különbségek figyelhetők meg még az azonos hatóanyag-tartalmú készítmények esetében is, amelyek nagymértékben befolyásolják a készítmény vízi szervezetekre gyakorolt toxicitását. A különböző adalékanyagok fizikai-kémiai tulajdonságaik, valamint a különféle biológiai kölcsönhatásokban történő részvételük és szerepük alapján így korántsem tekinthetők egyértelműen inaktív összetevőknek, ezért toxikológiai és ökotoxikológiai értékelésük elengedhetetlen feltétele a mezőgazdasági gyakorlatban alkalmazott készítmények környezeti kockázatelemzésének. Az adalékanyagok ökotoxikológiai értékelésének pedig alapvető feltétele az adalékanyagok megbízható és reprodukálható minőségi és mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek kidolgozása és fejlesztése. Az EU-ban jelenleg a gyártóknak csak az aktív hatóanyag(ok), szinergisták és az antidótumok pontos kémiai nevét és mennyiségét kell feltüntetniük a készítmények címkéin, így a készítmények pontos összetétele és az adjuvánsokkal kapcsolatos információk nem nyilvánosak (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2009b, EUROPEAN COMMISSION 2013b). Az adalékanyagok pontos mennyiségét iparjogi szempontból védett információként csak az engedélyezés során a hatóság felé benyújtott bizalmas kezelésű termékdokumentáció tartalmazza, azonban a környezeti kockázatértékelést az adalékanyagokra is előírják. A növényvédő szerek forgalomba hozatalát az Európai Parlament és a Tanács 1107/2009/EC rendelete szabályozza, melynek III. melléklete tartalmazná azon koformulánsok listáját, amelyek nem alkalmazhatóak a különböző készítmények előállítása során, azonban az említett melléklet jelenleg is üres még (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2009b). A POEA-t tartalmazó ROUNDUP CLASSIC esetében tapasztaltakhoz hasonlóan, a MEDALLON PREMIUM esetében is a vizsgált formázóanyag (APG) bizonyult a legtoxikusabb komponensnek. A terhelő tudományos eredmények hatására a POEA formázóanyagként való alkalmazása GLY-tartalmú készítményekben az EU hatályos jogi szabályozásának értelmében betiltásra került (EUROPEAN COMMISSION 2016). Habár az APG egyedi toxicitása *D. magna* és alga tesztorganizmeken nem olyan magas, mint a POEA esetében, hatással van a készítmény toxicitására, így az APG-vegyületekkel formázott GLY-tartalmú készítmények revíziója is szükséges lehet. Eredményeink alátámasztják és támogatják azokat a tudományos felvetéseket és javaslatokat, amelyek szerint a hatósági szabályozás változásaira, többek között az adalékanyagok szigorú szabályozására, a különböző kémia vegyületek keverékeinek környezeti kockázatait feltáró egyéséges megközelítésének jövőbeni kidolgozására és az együttes hatások kimutatását célzó új hatékony irányelvek kidolgozására, valamint bevezetésére van szükség (PANIZZI *et al.* 2017).

A természetes felszíni biofilmek vizsgálata során a biofilmnövesztéshez kialakított bójás szerkezet alkalmas egységes, statisztikailag egyforma algaegységek létrehozására, ugyanakkor a

különböző természetes körülmények között növesztett biofilmek érzékenységében jelentős különbségeket figyeltünk meg. A laboratóriumi körülményekhez a dunai és velencei-tavi biofilmek jól alkalmazkodtak, és a kezeletlen kontroll esetében a biofilmet alkotó algafajok biomasszája folyamatosan gyarapodott, míg a balatoniak esetében leépülés volt megfigyelhető. A vizsgált GLY-koncentráció (100 µg/l) hatást gyakorol az algaközösség biomasszamennyiségének alakulására, továbbá képes átrendezni az algaközösségek összetételét a felszíni vízi biofilmekben. A GLY elsősorban POEA jelenlétében a perifiton biomasszájának kezdeti csökkenését idézte elő. A vizsgált anyagok expozíciója során tapasztalt biomassza-csökkenést minden esetben egy toleránsabb, a vizsgált anyagokat kis koncentrációban hasznosítani képes, fokozatosan növekvő algaközösség kialakulása követte (PESCE *et al.* 2009), amely elsősorban a vizsgált ható- és formázóanyag szelekciós hatásaival magyarázható. A biofilmek elektronmikroszkópos elemzését követően mindkét kezelés hatására fokozott EPS-termelődés volt megfigyelhető, amely – amint más, hasonló expozíciók esetében (BOHUSS *et al.* 2005, DOMOZYCH 2007) is látható – a biofilm fokozott stresszválaszaként értékelhető. A tiszta hatóanyag és a POEA esetében tapasztalt hatások eltérő képet mutattak a különböző felszíni víztestek és évek esetében, amely elsősorban, a vízi élőhelyek specifikus környezeti paramétereiben (pl. pH, oldott oxigéntartalom) és a különböző periódusokat jellemző hőmérsékleti tényezők, továbbá a szezonálisan eltérő fajösszetételben megfigyelhető különbségek magyaráznak (PESCE *et al.* 2009, GOMES és JUNEAU 2017). A biofilmeken meghatározott növényvédő szeres kezelések hatásai szakirodalmi adatokkal történő összehasonlítása igen nehéz, mivel a különböző vizsgált biofilmek kolonizációjának körülményei (pl. szubsztrát típusa, időtartam) igen nagy variabilitást mutatnak a különböző vizsgálatok során, még egy adott hatóanyag esetében is, így a tapasztalt hatások értékelését és összevetését igen elővigyázatosan kell elvégezni. A természetes biofilmek kovaalga-közösségei jó indikátorai lehetnek a felszíni vizek GLY-szennyezésének, továbbá a kovaalgák biológiai jelleg-alapú vizsgálata, elősegíti a fajsztípus elemzéshez képest egyértelműbb adatkészlet alkalmazását a tendenciák összehasonlítása és a hipotézisek vizsgálata során. Bár a biofilmvizsgálatok nehezen standardizálhatók, így kevésbé reprodukálhatók, eredményeik alapján viszont pontosabb következtetéseket vonhatunk le a vízi ökoszisztémákra vonatkozóan. A biofilmeken elvégzett ökotoxikológiai vizsgálatok előnye, hogy a különböző szennyező anyagok káros hatásai közösségi szinten is vizsgálhatók, továbbá a standard, egy fajon végzett vizsgálatokkal szemben jobban reprezentálják a környezetben lezajló természetes folyamatokat, mivel természetes körülmények között nemcsak egy faj egyedei, hanem különböző fajok népségei kerülnek kapcsolatba a környezeti elemekben megjelenő xenobiotikumokkal, továbbá

a közösségi szinten elvégzett vizsgálatok során a különböző populációk egymásra gyakorolt hatásai is értékelhetők az expozíciót követően.

A *GLY* lebomlása eltérő képet mutatott tiszta hatóanyag és készítmény formájában és a két természetes víztestben egyaránt, amelyet elsősorban a különböző természetes vizek fizikai (pl. hőmérséklet, lebegő szilárd részecskék) és kémiai (pl. pH, oldott oxigéntartalom) jellemzőiben, továbbá a mikrobiális közösség összetételében megfigyelhető különbségek eredményeznek (GOLDSBOROUGH és BROWN 1993, TSUI és CHU 2003, SVIRIDOV *et al.* 2015). Eredményeink alapján látható, hogy a *POEA* jelenléte nemcsak a *GLY* formázott készítményeinek toxicitásában nyilvánul meg, hanem befolyásolja a *GLY* vízi környezeti koncentrációjának alakulását is. A biofilmek jelenléte szintén jelentős mértékben befolyásolja a hatóanyag környezeti sorsát a különböző felszíni vizekben. A növényvédőszer-hatóanyagok és -készítmények engedélyezése, valamint a környezeti kockázatok becslése jelenleg a laboratóriumi körülmények között, desztillált vízben elvégzett vizsgálatok eredményei alapján meghatározott DT_{50} -értékek alapján történik, azonban a szakirodalmi adatok és eredményeink alapján is elmondható, hogy az engedélyezési és kockázatbecslési folyamatokban alkalmazott DT_{50} -értékek folyamatos felülvizsgálata mellett, élőhelyspecifikus adatok meghatározására is szükség van. A lineáris alkil-benzol-szulfonátok (*LAS*) környezeti koncentrációjának alakulása felszíni vizekben szintén jelentős mértékben függ a vizes közeg (pl. lebegő szilárd részecskék jelenléte, mikrobiális közösség denzitása és összetétele) és bizonyos neonikotinoid-típusú hatóanyagok (*acetamiprid* (*ACE*), *imidacloprid*, *thiacloprid*) jelenlététől egyaránt. A *D. magna* tesztszervezeten elvégzett akut toxicitásvizsgálataink során a *LAS* toxicitását jelentős mértékben befolyásolja az *ACE* jelenléte, azonban eredményeink alapján látható, hogy a toxicitás mellett a formázóanyag környezeti sorsa is jelentős mértékben megváltozik a hatóanyag jelenlétében.

PhD-munkám eredményei felhívják a figyelmet arra, hogy az állatgyógyászati és növényvédőszer-készítmények engedélyezési és kockázatbecslési folyamataiban a kötelezően előírt ökotoxikológiai vizsgálatokat érdemes lehetőség szerint adott taxon több képviselőjén is elvégezni, valamint támogatják azokat a javaslatokat, amelyek szerint a hatósági szabályozás változásaira van szükség. A készítmények előállítása során felhasznált adalékanyagok jelenléte hatást gyakorol a formázott készítményekben kialakuló toxicitás mértékére, továbbá a hatóanyagok környezeti sorsára egyaránt, ezért ezen adalékanyagok nem tekinthetők egyértelműen inaktív összetevőknek. A formázószerkelet egyedi, valamint a hatóanyagokkal együttes toxikológiai és ökotoxikológiai értékelése elengedhetetlen feltétele a mezőgazdasági gyakorlatban alkalmazott készítmények megbízható környezeti kockázatelemzésének.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a humán- és állatgyógyászatban széles körben alkalmazott, antibakteriális hatású szulfonamid- és pirimidin-diamin-típusú vegyületek, a világszerte jelentős mennyiségben felhasznált neonikotinoid-típusú, rovarölő hatású és a piacvezető, gyomirtó hatású *glyphosate* (GLY) hatóanyagok felszíni vizekben való megjelenése globálisan tapasztalható jelenség. A különböző készítmények az aktív hatóanyagon kívül egyéb adalékanyagokat is tartalmaznak, amelyek legjelentősebb csoportját a felületaktív anyagok alkotják. Minthogy a formázási adalékanyagok a készítmény biológiai főhatásának szempontjából hatástalan vegyületek, ezeket sokáig általánosan inaktív összetevőknek minősítették, ezért az aktív hatóanyagokhoz képest az érvényes jogi szabályozás értelmében, esetükben egyszerűbb környezeti kockázatelemzés végrehajtása is elegendő volt. Számos tanulmányban azonban bizonyították a formázószerek magas önálló toxicitását, valamint a ható- és adalékanyagok együttes fokozott toxicitását. A nagy vízibolha (*Daphnia magna*), valamint a felszíni vizek planktonikus és bentonikus algaközösségei nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a vízi ökoszisztémákban és rendkívül érzékenyek a vízminőségben bekövetkező változásokra, így kiváló tesztszervezetként szolgálnak a vizekbe kerülő vegyi anyagok toxikus hatásainak vizsgálata és a környezeti kockázatok értékelése során. A különböző hatóanyagok közötti és az adalékanyagokkal együttes hatások vizsgálata kiemelt fontosságú, mivel a hatóanyagok többsége keverékek formájában van jelen környezetünkben.

PhD-munkám során a szulfonamid- [*sulfadiazine*, *sulfaguanidine* (SGD), *sulfamethazine* (SMZ), *sulfamethoxazole* (SMX)] és pirimidin-diamin-típusú [*trimethoprim* (TRI)] állatgyógyászati, valamint a neonikotinoid-típusú [*acetamiprid* (ACE), *clothianidin* (CLO), *thiacloprid* (TCL) és *thiametoxam* (TMX)] rovarirtószer-hatóanyagok egyedi és a formázott készítményeikben megtalálható adalékanyagokkal együttes, nagy vízibolha (*D. magna*) immobilizációjára és a glutation-S-transzferáz (GST) enzim aktivitására gyakorolt toxikus hatásait vizsgáltam. Az OECD 202 irányelvek alapján elvégzett akut immobilizációs vizsgálatok eredményei alapján jelentős különbségeket figyeltünk meg a vizsgált állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények akut toxicitásában. Vizsgálataink során az SGD bizonyult a legtoxikusabbnak, míg az SMZ, SMX és a TRI hatóanyagok kevésbé toxikusnak bizonyultak. Az SMX és TRI hatóanyagot tartalmazó készítmények vizsgálata során a SUMETROLIM jóval toxikusabbnak bizonyult a COTRIM E-ratiopharm hatásaihoz képest. A két hatóanyag SUMETROLIM készítményben feltüntetett koncentrációkkal ekvivalens keverékének vizsgálata során a TRI egyedi toxicitása alacsonyabbnak bizonyult a kialakuló együttes toxicitáshoz képest. A GST enzimaktivitás-vizsgálatok során az SMX és TRI hatóanyagok, valamint a SUMETROLIM

készítmény akut vizsgálatokban meghatározott 48h EC₂₀-értéknek megfelelő expozíciója az enzimaktivitás növekedését idézte elő.

A vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyagok egyedi és az adalékanyagokkal együttes toxicitásának összehasonlítása során az *ACE* és a *CLO* hatóanyagok egyedi toxicitásához képest, a készítményeik toxicitása jóval magasabbnak bizonyult, ezzel szemben a *TMX*-tartalmú készítmény toxicitása alulmaradt a hatóanyag egyedi toxicitásához képest. Az *ACE* és a formázóanyagként alkalmazott lineáris alkil-benzol-szulfonátok (*LAS*) *MOSPILAN 20 SG* készítményben feltüntetett koncentrációkkal ekvivalens keverékének vizsgálata során erős szinergens hatást tapasztaltunk, azonban a készítmény esetében, amely egyéb adalékanyagokat is tartalmaz a kombinált toxicitás csökkenése volt megfigyelhető. Az akut tesztekben megállapított 48h EC₂₀-értékek esetében meghatározott GST-enzimaktivitási értékek alapján az *ACE* egyedi és a formázóanyaggal együttes keverékének expozíciója során az enzimaktivitás csökkenését igazoltuk, ezzel szemben a készítmény és a *LAS* nem gyakorolt hatást a GST-aktivitásra.

A *GLY*-tartalmú készítmények összetevőinek egyedi és kombinált akut hatásait is meghatároztuk nagy vízíbolha (*D. magna*) immobilizációs tesztekben, továbbá különböző lebegő egysejtű zöld- és kékalgafajokon az *OECD* 201 protokoll alapján elvégzett algaszaporodás-gátlási vizsgálatokban és a fotoszintetikus aktivitás mérése során. Az akut immobilizációs vizsgálatokat a MATE KÖTI AKK laboratóriumi *D. magna*-tenyészetén és a MicroBioTests által forgalmazott Daphtoxkit F tesztcsomag által biztosított egyedeken is elvégeztük. A készítmények összetevőinek egyedi és kombinált toxicitásának vizsgálata során a toxicitás sorrendje mindkét vizsgált készítmény (*ROUNDUP CLASSIC*, *MEDALLON PREMIUM*) és *D. magna*-törzs esetében a következőképpen alakult: hatóanyag < készítmény < formázóanyag. Az algaszaporodás-gátlási vizsgálatok során a *GLY*-tartalmú készítmények és összetevőinek esetében az optikai denzitás és klorofill-a-tartalom mérése alapján meghatározott 72h EC₅₀-értékek toxicitási sorrendje többnyire a *D. magna* tesztszervezeten tapasztalt tendenciának megfelelően alakult a vizsgált zöldalgafajok esetében. A két mérési végpont esetében meghatározott 72h EC₅₀-értékekben megfigyelhető különbségek ellenére a toxicitásban megfigyelhető trendek jól követik egymást. A fitotoxikus hatások vizsgálata során a különböző algafajok érzékenységeiben szignifikáns különbségeket tapasztaltunk, még az azonos családba tartozó fajok esetében is. A *ROUNDUP CLASSIC* és összetevőinek algasejtek fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatásait *Pseudokirchneriella subcapitata* zöldalgafajon a gerjesztett klorofill-a-fluoreszcencia indukcióján alapuló módszerrel a PS II fotokémiai rendszer fotokémiai hatékonyságát jellemző Fv/Fp-értékek és a fotoszintetikus aktivitást jellemző *Rfd*-értékek alakulásának értékelésével határoztuk meg. Eredményeink alapján a készítmény és összetevői a fotoszintetikus aktivitás növekedését eredményezik az alacsony koncentrációtartományokban a

vizsgált algafajon, azonban a magasabb vizsgálati koncentrációk esetében az aktivitás csökkenését igazoltuk a készítmény és a POEA (polietoxilált faggyúaminok keveréke) egyedi expozícióját követően.

A különböző hazai felszíni víztestekben természetes körülmények között növesztett biofilmekben közösségi szinten vizsgáltuk a GLY-tartalmú ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek hatásait a biofilmek algaközösségeinek biomasszájára, a biofilmek szerkezetére és kovaalga-közösségeinek összetételére. A 2015-ben és 2016-ban biofilmekben elvégzett vizsgálataink során jelentős, hazai felszíni víztestekben (Balaton, Duna, Velencei-tó), természetes körülmények között 6 héten keresztül saját fejlesztésű speciális bójás szerkezeten (AKK-1 típusú algabója) elhelyezett üveglapokon biofilmet növesztettünk, majd a kezelések hatásait laboratóriumi körülmények között vizsgáltuk. A biofilmek algaközösségeinek összetételében és szerkezetében, valamint az algaközösség biomassza-mennyiségében megfigyelhető változásokat az *in vivo* fluoreszcencia alapján algafáklya használatával és pásztázó elektronmikroszkópos technikával vizsgáltuk. A ROUNDUP CLASSIC készítmény és összetevői (GLY: 100 µg/l, POEA: 37,4 µg/l) hatást gyakorolnak a hazai felszíni vízi biofilmek algaközösségeinek biomasszájára, ugyanis a különböző években a GLY hatóanyag az algabiomassza növekedését idézte elő a vizsgált biofilmekben, habár esetenként csak a biomassza kezdeti csökkenését követően. A formázott készítmény a kezelt biofilmek algabiomasszájának csökkenését eredményezte, amely alól kivételt csak a 2016. évi dunai adatsor képez, azonban ebben az esetben is a biomassza szignifikánsan lassabb növekedése volt megfigyelhető. A POEA esetében a biomasszaértékek növekedése volt megfigyelhető, azonban a velencei-tavi mintákban a tiszta hatóanyaghoz hasonlóan csak kezdeti csökkenést követően. A kezelt biofilmekben az algaközösségek átrendeződése volt megfigyelhető, ugyanis a kezelések hatásaival szemben érzékenyebb fajok helyét a toleránsabb, főként fonalas zöldalgafajok vették át, amelyek képesek a vizsgálati anyagokat tápanyagforrásként hasznosítani. A kísérlet végére a kezelések hatására a sejten kívüli, nyálkás exopolimerek fokozott termelődése volt megfigyelhető a kezelt biofilmekben a kontrollcsoporthoz képest, főleg POEA jelenlétében, amely a biofilmek esetében fokozott stresszválaszként értelmezhető. A vizsgált hazai felszíni vízi biofilmekben elvégzett, biológiai jelleg-alapú vizsgálatok alapján a kovaalga-közösségek sejtszámarányának szignifikáns változása figyelhető meg az idő előre haladásával a kontroll- és kezelt csoportokban a sejtméret- és az ökológiai *guild*-kategóriák vizsgálata során a balatoni és dunai biofilmmintákban egyaránt. A GLY kezelés a legkisebb és legnagyobb sejtméret-kategória relatív gyakoriságának megnövekedését eredményezte a dunai biofilmmintákban, azonban a balatoni biofilmmintákban a kezelt egységekben a legkisebb sejtméret-kategória növekedése erőteljesebb, a legnagyobb sejtméret-kategóriával szemben. A GLY az ökológiai *guild*-kategóriák relatív gyakoriságára csak

a dunai biofilmmintákban gyakorolt hatást, ahol az alacsony profilú *guild*-ek relatív gyakoriságának növekedését, míg a motilis *guild* gyakoriságának csökkenését igazoltuk a kezelés hatására a kontrollhoz képest.

Az ökotoxikológiai vizsgálataink mellett környezetanalitikai módszerekkel vizsgáltuk a *GLY* lebomlását felszínivízmintákban tiszta hatóanyag és formázott készítmény formájában, biofilmek jelenlétében és anélkül. A *GLY* természetes vizekben történő lebomlása igen eltérő képet mutatott a vizsgált hazai felszíni vizekben. A hatóanyag környezeti koncentrációjának alakulását a felszíni vizekben jelentősen befolyásolja a *POEA* és a biofilmek jelenléte.

A neonikotinoid-készítmények formázása során alkalmazott *LAS* lebomlását is különböző vízmintákban, továbbá különböző neonikotinoid-típusú hatóanyagok jelenlétében is vizsgáltuk, ahol a *LAS* lebomlását jelentős mértékben befolyásolják a vizes közeg tulajdonságai és a formázott készítményekben előforduló adalékanyagok. A *CLO* és *TMX* hatóanyagok jelenléte nem befolyásolta a *LAS* lebomlását, ezzel szemben az *ACE*, *imidacloprid* és *TCL* hatóanyagok megnövelték a *LAS* felezési idejét.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a vizsgált szulfonamid- és neonikotinoid-típusú hatóanyagok toxicitásában jelentős különbségek figyelhetők meg az egyes hatóanyagcsoportokon belül a viszonylag hasonló kémiai szerkezettel rendelkező vegyületek esetében. Az azonos törzsbe és családba tartozó tesztorganizmusok érzékenységi különbségei miatt az állatgyógyászati és növényvédőszer-készítmények engedélyezési és kockázatbecslési folyamataiban a kötelezően előírt toxicitás-vizsgálatokat érdemes lenne lehetőség szerint adott taxon több képviselőjén is elvégezni. A készítmények előállítása során alkalmazott adalékanyagok jelenléte hatást gyakorol a formázott készítményekben kialakuló toxicitás mértékére és a hatóanyagok környezeti sorsára egyaránt, ezért nem tekinthetők egyértelműen inaktív összetevőknek, így egyedileg, továbbá a hatóanyagokkal együttes toxikológiai és ökotoxikológiai értékelésük elengedhetetlen feltétele a mezőgazdasági gyakorlatban alkalmazott készítmények megbízható környezeti kockázatelemzésének.

8. SUMMARY

The appearance of the widely used antibacterial sulfonamide and diaminopyrimidine active ingredients in human and veterinary medicine, the worldwide used neonicotinoid insecticides and the market-leading herbicide active ingredient glyphosate (GLY) in surface water is a globally observed phenomenon nowadays. Formulations applied in veterinary medicine and chemical plant protection contain various additives besides their active ingredients, the most significant group of these additives being represented by surfactants. As formulation additives are inactive from the aspects of the required main biological effect of the pharmaceutical or pesticide, these additives have long been considered as generally inactive or inert components, therefore their authorization required simplified risk assessment compared to the active ingredients. Several studies proved the high individual toxicity of formulating agents and the increased combined toxicity between the active ingredients and additives in formulations. The water flea (*Daphnia magna*), as well as various planktonic and benthic algal communities in surface waters play an essential role in aquatic ecosystems, and due to their outstanding sensitivity to changes in water quality, they are excellent test organisms for assessing the toxic effects of chemicals entering water bodies and for the evaluation of corresponding environmental risks. The assessment of the combined toxic effects between active ingredients and additives is of utmost importance, as most of the active ingredients enter our environment in the form of mixtures.

During my PhD work, the effects of sulfonamide [sulfadiazine, sulfaguanidine (SGD), sulfamethazine (SMZ), sulfamethoxazole (SMX)] and diaminopyrimidine [trimethoprim (TRI)] type veterinary, as well as neonicotinoid [acetamiprid (ACE), clothianidin (CLO), thiacloprid (TCL) and thiametoxam (TMX)] type insecticide active ingredients on the immobilization of water fleas (*D. magna*) and on the activity of glutathione-S-transferase (GST) enzyme were investigated individually and in combination with the additives found in their formulated preparations. Based on the results of acute immobilization tests performed according to OECD 202 guideline, significant differences were observed in the acute toxicity of the investigated active ingredients and formulations used in veterinary medicine. Among the veterinary active ingredients investigated, SGD proved to be the most toxic, while SMZ, SMX and TRI proved to be less toxic. Between the formulated veterinary drugs investigated, containing SMX and TRI, SUMETROLIM was more toxic than COTRIM E-ratiopharm. During the assessment of the combined effects of SMX and TRI investigated together at concentrations equivalent to SUMETROLIM, the individual toxicity of TRI was lower than the combined toxicity of the two active ingredients. In GST enzyme activity assays, the exposure to SMX, TRI and SUMETROLIM resulted in increased

enzymatic activity at concentrations correspond to the 48h EC₂₀ values originated from the acute immobilization tests.

Comparing the individual and combined toxicity of the neonicotinoid active ingredients and additives, the individual toxicity of ACE and CLO was lower, than that of their formulations, in contrast to TMX-based formulation, where the individual toxicity of the corresponding active ingredient is higher compared to the combined effect. A strong synergistic effect was observed when the combined effect of ACE and linear alkyl benzene sulfonates (LAS) used as formulating agents was investigated in pure form (a mixture of neat ACE and LAS at equivalent concentrations to their formulated product MOSPILAN 20 SG), but reduced combined toxicity was observed for the formulation containing other additives. Based on the GST enzyme activity values determined for the compounds investigated at concentrations corresponding to the 48h EC₂₀ values originated from acute immobilization tests, decreased enzymatic activity was demonstrated after the exposure to ACE alone and in the presence of LAS, while the formulating agent alone and the formulation had no effect on GST activity.

The individual and combined acute toxicity of the components of GLY-based formulations were also determined in water flea (*D. magna*) immobilization tests, as well as in algal growth inhibition tests performed according to OECD 201 guideline and photosynthetic activity assays on various floating unicellular green and blue algae species. Acute immobilization tests were also performed in MATE KÖTI own laboratory on *D. magna* culture and on juveniles provided by the Daphtoxkit F test kit distributed by MicroBioTests. In the study of the individual and combined toxicity of the components of the formulations, the order of toxicity for both tested preparations (ROUNDUP CLASSIC, MEDALLON PREMIUM) and *D. magna* strains was as follows: active ingredient < formulations < formulating agents. In the algal growth inhibition tests on the investigated green algae species, the order of toxicity for GLY-based formulations and its components was mostly in line with the trend observed for *D. magna* on the basis of 72h EC₅₀ values calculated from the result of optical density and chlorophyll-a-content measurements. Despite the differences observed in 72h EC₅₀ values determined for the two measurement endpoints, a good correlation was observed between the trends in toxicity. In the study of phytotoxic effects, significant differences were found in the sensitivity of different algae species, even for species belonging to the same family. The effects of ROUNDUP CLASSIC and its components on the photosynthetic activity of algal cells by a method based on chlorophyll-a fluorescence induction was investigated on a green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*; the effects were evaluated by the measurements of Fv/Fp values connected to the photochemical efficiency of the PS II photochemical system and Rfd values characterizing photosynthetic activity. Based on our results, an increase in photosynthetic activity was detected after the

exposure to the formulation and its components in the low concentration ranges on the investigated green algae, but at higher test concentrations, a decrease in activity was observed after the exposure to the formulation and POEA (a mixture of polyethoxylated tallow amines).

The effects of GLY-based ROUNDUP CLASSIC and its components on the biomass of algal communities in biofilms, the structure of biofilms and the composition of diatom communities were investigated at community level in biofilms grown under natural conditions in different Hungarian surface water bodies. During our investigations on biofilms in 2015 and 2016, natural biofilms were grown on glass substrates fixed on a specially developed buoy structure (AKK-1 type carrier buoys) in major domestic surface water bodies (Lake Balaton, River Danube, Lake Velencei) for 6 weeks under natural conditions, and then the effects of the treatments were studied under laboratory conditions. Effects on the composition and biomass of the algal community in biofilms and on the structure of biofilms were determined by an algae torch instrument based on *in vivo* fluorescence of algae cells and scanning electron microscopy. The effects of ROUNDUP CLASSIC and its components (GLY: 100 µg/l, POEA: 37.4 µg/l) were demonstrated on the biomass of algal communities in domestic surface water biofilms, while small modulations in algal biomass in the investigated biofilms as a result of GLY treatment were detected in different years, in some cases only after an initial decrease in biomass. The formulated preparation treatment resulted in a decrease in the algal biomass of the exposed biofilms, except for the Danube data set from 2016, however, significantly slower increase in biomass was observed in this case as well. An increase in biomass values was caused by POEA treatment, however, in samples originated from Lake Velencei, similarly to the active ingredient, only after an initial decrease. The realignment of algal communities was observed in the treated biofilms, as more sensitive species to the effects of treatments were replaced by more tolerant mainly filamentous green algae species, which can utilize the test substances as a source of nutrients. At the end of the experiment, increased production of extracellular, mucous exopolymers was observed in the treated biofilms compared to the control group, mainly in the presence of POEA, which can be interpreted as an increased stress response in biofilms. Based on the result of the performed trait-based method using the examination of the biological characteristics, a significant change can be observed in the cell number ratio of the diatom communities over time in the control and treated groups during the analysis of cell size and ecological guild categories, in biofilms originated from Lake Balaton and River Danube as well. GLY treatment resulted in an increase in the relative frequency of the smallest and largest cell size categories in biofilm samples originated from River Danube, however, the increase in the smallest cell size category was stronger in the treated biofilm samples from Lake Balaton compared to the largest cell size category. The effects of GLY were detected on the relative

frequency of ecological guild categories only in biofilm samples originated from River Danube, where an increase in the relative frequency of low-profile guilds and a decrease in the frequency of the motile guild were confirmed compared to the control.

In addition to our ecotoxicological studies, the degradation of GLY was investigated in different surface water samples in the form of pure active ingredient and formulated preparation as well, and GLY degradation was investigated in the presence of biofilms as well. A rather varying tendency of GLY degradation was observed in the investigated natural surface waters. In surface water, the environmental concentration of the active ingredient is significantly affected by the presence of POEA and biofilms.

The degradation of LASs used as formulating agents in the formulation of neonicotinoids was also studied in different water samples, as well as in the presence of different neonicotinoid active ingredients, where the degradation of LAS is significantly influenced by the properties of the aqueous medium and the presence of additives in the formulation. The degradation of LAS was not affected by the presence of CLO and TMX, whereas increased half-life was observed in the presence of ACE, imidacloprid and TCL.

Our results indicate significant differences within each substance class in the toxicity of the tested sulfonamide and neonicotinoid active ingredients in spite of the similarities in the chemical structures of the compounds in each group. Moreover, due to the differences observed in the sensitivity of test organisms belonging to the same strain and family, the implementation of the toxicity tests on several members of a given taxon is advised to be included in the authorization and risk assessment protocols for veterinary and plant protection products. The combined toxicity of the formulations and the environmental fate of active ingredients are highly affected by formulating agents applied in the formulated preparations, therefore additives (e.g. surfactants) cannot be classified as unequivocally inert components, hence their (eco)toxicological evaluation individually and in combination with the active ingredients is essential during a reliable environmental risk assessment of formulations used in agricultural practice.

1. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK

- ABELLÁN, M.N., BAYARRI, B., GIMÉNEZ, J., COSTA, J. (2007): Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental*, **74**, 233-241.
- ÁCS, É., SZABÓ, K., KISS, K.Á., TÓTH, B., ZÁRAY GY., KISS, K.T. (2006): Investigation of epilithic algae on the Danube River from Germany to Hungary and the effect of a very dry year on the algae of the Danube River. *Large Rivers*, **16**, 389-417.
- ÁCS, É., KISS, K.T. (2007): Az algák törzsei. In: ÁCS, É., KISS, K.T., BALOGH, J., NAGY, J., CZÓBEL, SZ., NAGY, Z., CSERHALMI, D., ORBÁN, S., ENGLONER, A., PODANI, J., FARKAS, E., SZERDAHELYI, T., FÓTI SZ., SZIRMAI, O., JAKUCS, E., TUBA, Z. (Szerk.): *Botanika II*. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó Zrt., pp. 241-276.
- ALBERDI, J.L., SÁENZ, M.E., DI MARZIO, W.D., TORTORELLI, M.C. (1996): Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**, 229-235.
- ALLEN, M.M. (1968): Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*, **4**, 1-4.
- AL-TAHHAN, R.A., SANDRIN, T.R., BODOUR, A.A., MAIER, R.M. (2000): Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3262-3268.
- ANDERSON, J.C., DUBETZ, C., PALACE, V.P. (2015): Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, **505**, 409-422.
- ANSKJAER, G.G., RENDAL, C., KUSK, K.O. (2013): Effect of pH on the toxicity and bioconcentration of sulfadiazine on *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **91**, 1183-1188.
- ARUNAKUMARA, K.K.I.U., WALPOLA, B.C., YOON, M. (2013): Metabolism and degradation of glyphosate in aquatic cyanobacteria: a review. *African Journal of Microbiology Research*, **7**, 4084-4090.
- ÁRVA, D., TÓTH, M., HORVÁTH, H., NAGY, S.A., SPECZIÁR, A. (2015): The relative importance of spatial and environmental processes in distribution of benthic chironomid larvae within a large and shallow lake. *Hydrobiologia*, **742**, 249-266.
- ARYSTA LIFESCIENCE (2013): Biztonsági adatlap – Apache 50 WG. https://www.marex.sk/files/2018-04-23-143811-APACHE_50_WG_.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.

- ASHAUER, R., HINTERMEISTER, A. POTTHOFF, E., ESCHER, B.I. (2011): Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. *Aquatic Toxicology*, **103**, 38-45.
- ASTM (1991): ASTM E1218 – 04 Standard guide for conducting static toxicity tests with microalgae. West Conshohocken, USA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM (2004): ASTM E1193 – 97 Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. West Conshohocken, USA: American Society for Testing and Materials.
- AUSTIN, A.P., HARRIS, G.E., LUCEY, W.P. (1991): Impact of an organophosphate herbicide (glyphosate) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**, 29-35.
- BACH, N.C., MARINO, D.J.G., NATALE, G.S., SOMOZA, G.M. (2018): Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, **202**, 289-297.
- BAIRD, D.J., BARBER, I., BRADLEY, M., SOARES, A.M.V.M., CALOW, P. (1991): A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- BAKONYI, G. (2020a): Ökotoxikológia és hatásági munka. In: BAKONYI, G. (Szerk.): *Bevezetés az ökotoxikológiába*. <https://okotoxjegyzet.hu/index.php/tartalomjegyzek/2-uncategorised/26-21-okotoxikologia-es-hatosagi-munka>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- BAKONYI, G. (2020b): A szennyező anyagok együttes hatása populációkra. In: BAKONYI, G. (Szerk.): *Bevezetés az ökotoxikológiába*. <https://okotoxjegyzet.hu/index.php/tartalomjegyzek/2-uncategorised/17-12-a-szennyezo-anyagok-egyutt-es-hatasa-populaciokra>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- BARAHONA, F., TURIEL, E., MARTÍN-ESTEBAN A. (2008): Sample handling of pesticides in food and environmental samples. In: TADEO J.L. (Szerk.): *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 35-94.
- BARAN, W., ADAMEK, E., ZIEMIANSKA, J., SOBCZAK, A. (2011): Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, **196**, 1-15.
- BARATA, C., VARO, I., NAVARRO, J.C., ARUN, S., PORTE, C. (2005): Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, **140**, 175-186.

- BARÓCSI, A., KOCSÁNYI, L., VÁRKONYI, S., RICHTER, P. CSINTALAN, ZS., SZENTE, K. (2000): Two-wavelength, multipurpose, truly portable chlorophyll fluorometer and its application in field monitoring of phytoremediation. *Measurement Science and Technology*, **11**, 717-729.
- BARÓCSI, A., LENK, S., KOCSÁNYI, L., BUSCHMANN, C. (2009): Excitation kinetics during induction of chlorophyll a fluorescence. *Photosynthetica*, **47**, 104-111.
- BASHIR, K.M.I., CHO, M.-G. (2016): The effect of kanamycin and tetracycline on growth and photosynthetic activity of two chlorophyte algae. *BioMed Research International*, **2016**, Article ID 5656304.
- BASS, C., DENHOLM, I., WILLIAMSON, M.S., NAUEN, R. (2015): The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **121**, 78-87.
- BATTIN, T.J., KAPLAN, L.A., NEWBOLD, J.D., HANSEN, C.M.E. (2003): Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*, **426**, 439-442.
- BAYER CROPSCIENCE (2016): Biztonsági adatlap – Calypso 480 SC. https://ipad.bayerhungaria.hu/cropscience/content/gazdainfo/v2/online/pdf_43_termekek_biztonsagtechnikaiokirat/pdf_43_termekek_biztonsagtechnikaiokirat.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- BBE MOLDAENKE (2020): BenthosTorch. <https://www.bbe-moldaenke.de/en/products/chlorophyll/details/benthosTorch.html>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02
- BEKETOV, M.A., LIESS, M. (2008): Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **55**, 247-253.
- BELANGER, S.E., BOWLING, J.W., LEE, D.M., LEBLANC, E.M., KERR, K.M., McAVOY, D.C., CHRISTMAN, S.C., DAVIDSON, D.H. (2002): Integration of aquatic fate and ecological responses to linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in model stream ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **52**, 150-171.
- BENBROOK, C.M. (2016): Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, **28**, 3.
- BENEITO-CAMBRA, M., RIPOLL-SEGUER, L., HERRERO-MARTÍNEZ, J.M., SIMÓ-ALFONSO, E.F., RAMIS-RAMOS G. (2011): Determination of fatty alcohol ethoxylates and alkylether sulfates by anionic exchange separation, derivatization with a cyclic anhydride and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 8511-8518.

- BERGÉ, A., WIEST, L., BAUDOT, R., GIROUD, B., VULLIET, E. (2018): Occurrence of multi-class surfactants in urban wastewater: contribution of a healthcare facility to the pollution transported into the sewerage system. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 9219-9229.
- BERGSTRÖM, L., BÖRJESSON, E., STENSTRÖM, J. (2011): Laboratory and lysimeter studies of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a sand and a clay soil. *Journal of Environmental Quality*, **40**, 98-108.
- BERTHON, V., BOUCHEZ, A., RIMET, F. (2011): Using life-forms and ecological guilds to assess organic pollution and trophic level in rivers: a case study of rivers in south-eastern France. *Hydrobiologia*, **673**, 259-271.
- BESEMER, K., MOESENEDER, M.M., ARRIETA, J.M., HERNDL, G.J., PEDUZZI, P. (2005): Complexity of bacterial communities in a river-floodplain system (Danube, Austria). *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 609-620.
- BIALK-BIELINSKA, A., KUMIRSKA, J., STEPNOWSKI, P. (2013): What do we know about the chronic and mixture toxicity of the residues of sulfonamides in the environment? In: RASHED, M.N. (Szerk.): *Organic pollutants-monitoring, risk and treatment*. London: IntechOpen, pp. 59-86.
- BINELLI, A., PAROLINI, M., COGNI, D., PEDRIALI, A., PROVINI, A. (2009): A multi-biomarker assessment of the impact of the antibacterial trimethoprim on the non-target organism Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, **150**, 329-336.
- B. KOVÁCS, A., SZOKOLÓCZY, I., BACSFAY, N., FELKAI, F., TÓTH, J. (1978): A Sumetrolim inj. ad us. vet. profilaktikus hatásnak és klinikai tünetekben megnyilvánuló mellékhatásainak vizsgálata. *Magyar állatorvosok lapja*, **33**, 624-627.
- BLINN, D., FREDERICKSEN, A., KORTE, V. (1980): Colonization rates and community structure of diatoms on three different rock substrata in a lotic system. *British Phycological Journal*, **15**, 303-310.
- BOHUSS, I., RÉKASI, T., SZIKORA, S., BARKÁCS, K., ZÁRAY, G., ÁCS, É. (2005): Interaction of acetochlor and atrazine with natural freshwater biofilms grown on polycarbonate substrate in lake Velence (Hungary). *Microchemical Journal*, **79**, 201-205.
- BOLD, H.C., WYNNE, M.J. (1985): Introduction to the algae, structure and reproduction. Englewood Cliffs, USA: Prentice-Hall, Inc., 706 pp.
- BONA, M.D., ZOUNKOVÁ, R., MERLANTI, R., BLAHA, L., DE LIGUORO, M. (2014): Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **113**, 152-158.

- BONMATIN, J.-M., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D.P., KRUPKE, C., LIESS, M., LONG, E., MARZARO, M., MITCHELL, E.A.D., NOOME, D.A., SIMON-DELISO, N., TAPPARO, A. (2014): Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 35-67.
- BONMATIN, J.-M., NOOME, D.A., MORENO, H., MITCHELL, E.A.D., GLAUSER, G., SOUMANA, O.S., BIJLEVELD VAN LEXMOND, M., SÁNCHEZ-BAYO, F. (2019): A survey and risk assessment of neonicotinoids in water, soil and sediments of Belize. *Environmental Pollution*, **249**, 949-958.
- BOOCOCK, M.R., COGGINS, J.R. (1983): Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters*, **154**, 127-133.
- BOTERO-COY, A.M., IBÁÑEZ, M., SANCHÓ, J.V., HERNÁNDEZ, F. (2013): Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *Journal of Chromatography A*, **1313**, 157-165.
- BOWNIK, A., PAWLOCIK, M., SOKOLOWSKA, N. (2017): Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia magna*. *Polish Journal of Natural Sciences*, **32**, 481-493.
- BOXALL, A.B., KOLPIN, D.W., TOLLS, J. (2003): Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science and Technology*, **37**, 286-294.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- BRAUSCH, J.M., BEALL, B., SMITH, P.N. (2007): Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **78**, 510–514.
- BROOKS, W. (2001): Trimethoprim-sulfa (Bactrim, Tribissen, Septra, Sulfatrim, Cotrim). <https://veterinarypartner.vin.com/default.aspx?pid=19239&id=4951493>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- BROZE, G. (1999): Detergents: technical and practical challenges. In: BROZE, G. (Szerk.): *Handbook of detergents Part A: Properties*. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 1-4.
- BRYERS, J.D. (1984): Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 948-958.
- BUCKINGHAM, S., LAPIED, B., CORRONC, H., SATTELLE, F. (1997): Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Journal of Experimental Biology*, **200**, 2685-2692.

- BURAKOVA, Y., MADERA, R., McVEY, S., SCHLUP, J.R., SHI, J. (2017): Adjuvants for animal vaccines. *Viral Immunology*, **31**, 11-22.
- BYER, J.D., STRUGER, J., KLAWUNN, P., TODD, A., SVERKO, E. (2008): Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: An evaluation. *Environmental Science and Technology*, **42**, 6052-6057.
- BYRNE, F.J., TOSCANO, N.C. (2006): Uptake and persistence of imidacloprid in grapevines treated by chemigation. *Crop Protection*, **25**, 831-834.
- BYRNE, F.J., URENA, A.A., ROBINSON, L.J., KRIEGER, R.I., DOCCOLA, J., MORSE, J.G. (2012): Evaluation of neonicotinoid, organophosphate and avermectin trunk injections for the management of avocado thrips in California avocado groves. *Pest Management Science*, **68**, 811-817.
- CARLES, L., GARDON, H., JOSEPH, L., SANCHÍS, J., FARRÉ, M., ARTIGAS, J. (2019): Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. *Environment International*, **124**, 284-293.
- CARPENTIER, C., DAHLHAUS, A., VAN DE GIESEN, N., MARSÁLEK B. (2013): The influence of hard substratum reflection and calibration profiles on *in situ* fluorescence measurements of benthic microalgal biomass. *Environmental Science: Processes and Impacts*, **15**, 783-793.
- CARRASCO, A. (2013): Teratogenesis by glyphosate based herbicides and other pesticides. Relationship with the retinoic acid pathway. In: BRECKLING, B., VERHOEVEN, R. (Szerk.): *GM-crop cultivation – Ecological effects on a landscape scale. Theorie in der Ökologie 17*. Frankfurt: Peter Lang, pp. 113-117.
- CARUSO, G. (2019): Microbial colonization in marine environments: Overview of current knowledge and emerging research topics. *Journal of Marine Science and Engineering*, **8**, 78.
- CASTRO, M.J.L., OJEDA, C., CIRELLA, A.F. (2014): Advances in surfactants in agrochemicals. *Environmental Chemistry Letters*, **12**, 85-89.
- CATTANEO, A., COUILLARD, Y., WUNSAM, S., COURCELLES, M. (2004): Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology*, **32**, 163-175.
- CAZELLES, B., FONTVIEILLE, D., CHAU, N.P. (1991): Self-purification in a lotic ecosystem: a model of dissolved organic carbon and benthic microorganisms dynamics. *Ecological Modelling*, **58**, 91-117.
- CCME (2007): Canadian water quality guidelines: imidacloprid. Scientific Supporting Document. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment, pp. 10-19.

- CEDERGREEN, N., STREIBIG, J.C. (2005): The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science*, **61**, 1152-1160.
- CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. (1990): Physiological ecology in biofilm systems. In: CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. (Szerk.): *Biofilms*. New York, USA: John Wiley & Sons, pp. 341-394.
- CHEN, X.D., CULBERT, E., HEBERT, V., STARK, J.D. (2010): Mixture effects of the nonylphenyl polyethoxylate, R-11 and the insecticide, imidacloprid on population growth rate and other parameters of the crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 132-137.
- CHITESCU, C.L., KAKLAMANOS, G., NICOLAU, A.I., STOLKER, A.A.M. (2015): High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. *Science of the Total Environment*, **532**, 501-511.
- CHOI, C.J., BERGES, J.A., YOUNG, E.B. (2012): Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae. *Water Research*, **46**, 2615-2626.
- CHOI, J.Y., KIM, S.-K., LA, G.-H., CHANG, K.-H., KIM, D.-K., JEONG, K.-Y., PARK, M.S., JOO, G.-J., KIM, H.-W., JEONG, K.-S. (2016): Effects of algal food quality on sexual reproduction of *Daphnia magna*. *Ecology and Evolution*, **6**, 2817-2832.
- COBB, A.H., READE, J.P. (2010): The inhibition of amino acid biosynthesis. In: COBB, A.H., READE, J.P. (Szerk.): *Herbicides and plant physiology*. Oxford: Wiley-Blackwell, pp. 176-197.
- CORADA-FERNÁNDEZ, C., GONZÁLEZ-MAZO, E., LARA-MARTÍN, P.A. (2018): Evaluation of the anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) using OECD 308 water/sediment systems. *Journal of Hazardous Materials*, **360**, 24-31.
- CORCOLL, N., CASELLAS, M., HUERTA, B., GUASCH, H., ACUNA, V., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., SERRA-COMPTE, A., BARCELÓ, D., SABATER, S. (2015): Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. *Science of the Total Environment*, **503-504**, 159-170.
- COSTERTON J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995): Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, **49**, 711-745.
- COUPE, R.H., KALKHOFF, S.J., CAPEL, P.D., GREGOIRE, C. (2012): Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science*, **68**, 16-30.

- CUHRA, M., TRAAVIK, T., BOHN, T. (2013): Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, **22**, 251-262.
- CULP, J.M., LOWELL, R.B., CASH, K.J. (2000): Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 1167-1173.
- DABNEY, B.L., PATINO, R. (2018): Low-dose stimulation of growth of the harmful alga, *Prymnesium parvum*, by glyphosate and glyphosate-based herbicides. *Harmful Algae*, **80**, 130-139.
- DARVAS, B. (2000): Virágot Oikosnak. Kísértések kémiai és genetikai biztonságunk ürügyén. Budapest: L'Harmattan, 430 pp.
- DARVAS, B., FEJES, Á., MÖRTL, M., BOKÁN, K., BÁNÁTI, H., FEKETE, G., SZÉKÁCS, A. (2011): A glyphosate alkalmazásának környezet-egészségügyi problémái. *Növényvédelem*, **47**, 387-401.
- DARVAS B., SZÉKÁCS A. (2018a) A glyphosate – Alkalmazás és környezetanalitika. *Magyar Kémikusok Lapja*, **73**, 186-190.
- DARVAS B., SZÉKÁCS A. (2018b) A glyphosate – Toxikológia és ökotoxikológia. *Magyar Kémikusok Lapja*, **73**, 244-248.
- DARVAS B., SZÉKÁCS A. (2018c) A glyphosate – Viták az újraengedélyezés körül. *Magyar Kémikusok Lapja*, **73**, 273-278.
- DE ALMEIDA, A., DO COUTO, H.T.Z., DE ALMEIDA, A.F. (2010): Camouflaging of seeds treated with pesticides mitigates the mortality of wild birds in wheat and rice crops. *Scientia Agricola*, **67**, 176-182.
- DE CAMPOS OLIVEIRA, R., VILAS BOAS, L.K., ZANINI BRANCO, C.C. (2016): Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia*, **55**, 577-584.
- DEFARGE, N., TAKÁCS, E., LOZANO, V.L., MESNAGE, R., DE VENDÔMOIS, J.S., SÉRALINI, G.-E., SZÉKÁCS, A. (2016): Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **13**, 264.
- DE LIGUORO, M., FIORETTO, B., POLTRONIERI, C., GALLINA, G. (2009): The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere*, **75**, 1519-1524.

- DE LIGUORO, M., Di LEVA, V., GALLINA, G., FACCIO, E., PINTO, G., POLLIO, A. (2010): Evaluation of the aquatic toxicity of two veterinary sulfonamides using five test organisms. *Chemosphere*, **81**, 788-793.
- DE LIGUORO, M., Di LEVA, V., BONA, M.D., MERLANTI, R., CAPORALE, G., RADAELLI, G. (2012): Sublethal effects of trimethoprim on four freshwater organisms. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, **82**, 114-121.
- DEMETRIO, P.M., BONETTO, C., RONCO, A.E. (2014): Effect of cypermethrin, chlorpyrifos, and glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **93**, 268-273.
- DE VOOGT, P., KNEPPER, T.P. (2003): Quantification and quality assurance in surfactant analysis. In: KNEPPER, T.P., BARCELO, D., DE VOOGT, P. (Szerk.): *Analysis and fate of surfactants and the aquatic environment*. Amsterdam: Elsevier, pp. 443-523.
- DICK, R., LORENZ, N., WOJNO, M., LANE, M. (2010): Microbial dynamics in soils under long-term glyphosate tolerant cropping systems. *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science*, **1**, 2007-2010.
- DI CORCIA, A. (1998): Characterisation of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **794**, 165-185.
- DILL, G.M., SAMMONS, R.D., FENG, P.C.C., KOHN, F., KRETZMER, K., MEHRSHEIKH, A., BLEEKE, M., HONEGGER, J.L., FARMER, D., WRIGHT, D., HAUPFEAR, E.A. (2010): Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, V.K. (Szerk.): *Glyphosate resistance in crops and weeds: History, development, and management*. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1-33.
- DOMINGUEZ-CORTINAS, G., SAAVEDRA, J.M., SANTOS-MEDRANO, G.E., RICO-MARTÍNEZ, R. (2008): Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **90**, 377-384.
- DOMOZYCH, D.S. (2007): Exopolymer production by the green alga *Penium margaritaceum*: Implications for biofilm residency. *International Journal of Plant Sciences*, **168**, 763-774.
- DORIGO, U., BOURRAIN, X., BÉRARD, A., LEBOULANGER, C. (2004): Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Science of the Total Environment*, **318**, 101-114.
- DROPPO, I.G. (2009). Biofilm structure and bed stability of five contrasting freshwater sediments. *Marine and Freshwater Research*, **60**, 690-699.
- DUKE, S.O., POWLES, S.B. (2008): Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, **64**, 319-325.

- DZIENGO-CZAJA, M., KOSS, J., MATUSZAK, A. (2008): Teratological forms of diatoms (*Bacillariophyceae*) as indicators of water pollution in the western part of Puck Bay (southern Baltic Sea). *Oceanological and Hydrobiological Studies*, **37**, 119-132.
- EBERT, D. (2005): Chapter 2. Introduction to *Daphnia* biology. In: EBERT, D. (Szerk.): *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia*. Bethesda, USA: National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, pp. 1-21.
- ECDC (2018): Antimicrobial consumption. In: ECDC (Szerk.): *Annual epidemiological report for 2017*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 23 pp.
- EDWARDS, W.M., TRIPLETT, G.B., KRAMER, R.M. (1980): A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal of Environmental Quality*, **9**, 661-665.
- EFSA (2005): European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the on the “Assessment of the human and animal BSE risk posed by tallow with respect to residual BSE risk”. *EFSA Journal*, **31**, 153-162.
- EFSA (2015): European Food Safety Authority: Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, **13**, 4302.
- EGEIS (2020): European Glyphosate Environmental Information Sources: Aquatic ecotoxicity of glyphosate and formulated products containing glyphosate. <http://www.egeis.org/cd-info/Aquatic-ecotoxicity-of-glyphosate-and-formulated-products-containing-glyphosate.pdf>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- ENTZ, G., SEBESTYÉN, O. (1942): Élőhelyek a Balatonban. In: ENTZ, G., SEBESTYÉN, O. (Szerk.): *A Balaton élete*. Királyi Magyar Természettudományi Társulat, pp. 366.
- EMA (2021): European Medicines Agency: EU Veterinary Medicinal Product Database. http://vet.eudrapharm.eu/vet/selectLanguage.do?NOCookie=NOCookie&NEW_SESSION=true. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- EUROPEAN COMMISSION (2004): Acetamiprid SANCO/1392/2001. Brussel: Health and Consumer Protection Directorate General, European Commission, 34 pp.
- EUROPEAN COMMISSION (2013a): Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. *Official Journal of the European Union*, **L139**, 12-26.
- EUROPEAN COMMISSION (2013b): Commission regulation (EU) No 284/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning

the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Union*, **L93**, 85-151.

EUROPEAN COMMISSION (2016): Commission Implementing Regulation (EU) 2016/1313 of 1 August 2016 amending Implementation Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance glyphosate. *Official Journal of the European Union*, **L208**, 1-3.

EUROPEAN COMMISSION (2018a): Commission Implementing Regulation (EU) No 783/2018 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance imidacloprid. *Official Journal of the European Union*, **L132**, 31-34.

EUROPEAN COMMISSION (2018b): Commission Implementing Regulation (EU) No 784/2018 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance clothianidin. . *Official Journal of the European Union*, **L132**, 35-39.

EUROPEAN COMMISSION (2018c): Commission Implementing Regulation (EU) 2018/785 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance thiamethoxam. *Official Journal of the European Union*, **L132**, 40-44.

EUROPEAN COMMISSION (2018d): Commission Implementing Regulation (EU) 2018/113 of 24 January 2018 renewing the approval of the active substance acetamiprid in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. *Official Journal of the European Union*, **L20**, 7-10.

EUROPEAN COMMISSION (2021): EU Pesticides database. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db_en. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL (1998): Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Union*, **L330**, 32-54.

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL (2000): 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 Union*, **L327**, 1-73.

- EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL (2009a): Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, **L152**, 11-22.
- EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL (2009b): Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing council directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, **L309**, 1-50.
- EWACHA, M.V.A., GOLDSBOROUGH, L.G. (2013): The response of *Scenedesmus quadricauda* and *Selenastrum capricornutum* to glyphosate toxicity (Roundup® formulation) with cellular growth and chlorophyll-a synthesis as endpoints. *Proceedings of Manitoba's Undergraduate Science and Engineering Research*, **1**, 1-19.
- FAO (2001): Food and Agriculture Organization Specifications and evaluations for plant protection products: Glyphosate N-(phosphonomethyl)glycine. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/glypho01.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- FAO (2010): Food and Agriculture Organization Specifications and evaluations for agricultural pesticides. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Thiacloprid_2010.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- FEDERLE, T.W., VENTULLO, R.M. (1990): Mineralization of surfactants by the microbiota of submerged plant detritus. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 333-339.
- FELFÖLDY, L. (1987): A biológiai vízminőség. Vízügyi Hidrobiológia 16. Budapest: VGI. 258 pp.
- FERNANDES, G., APARICIO, V.C., BASTOS, M.C., DE GERÓNIMO, E., LABANOWSKI, J., PRESTES, O.D., ZANELLA, R., DOS SANTOS, D.R. (2019): Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil. *Science of the Total Environment*, **651**, 1377-1387.
- FERNÁNDEZ-RAMOS, C., BALLESTEROS, O., BLANC R., ZAFRA-GÓMEZ, A., JIMÉNEZ-DÍAZ, I., NAVALÓN, A., VÍLCHEZ, J.L. (2012): Determination of alcohol sulfates in wastewater treatment plant influents and effluents by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, **98**, 166-171.

- FERRARI, B., MONS, R., VOLLAT, B., FRAYSSE, B., PAXÉUS, N., LO GIUDICE, R., POLLIO, A., GARRIC, J. (2004): Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 1344-1354.
- FINNEGAN, M.C., BAXTER, L.R., MAUL, J.D., HANSON, M.L., HOEKSTRA, P.F. (2017): Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of aquatic primary producers, invertebrates, and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **36**, 2838-2848.
- FIORINO, E., SEHONOVA, P., PLHALOVA, L., BLAHOVA, J., SYOBODOVA, Z., FAGGIO, C. (2018): Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 8542-8549.
- FISHEL, F.M. (2005): What are inert ingredients? <https://edis.ifas.ufl.edu/pi081>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J. (2010): The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 623-633.
- FOLMAR, L.C., SANDERS, H.O., JULIN A.M. (1979): Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Environmental Contamination and Toxicology*, **8**, 269-278.
- FORBIS, A.D., BOUDREAU, P. (1981): Acute toxicity of MON0139 (Lot LURT 12011)(AB-81-074) to *Daphnia magna*: Static acute bioassay report no. 27203. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-103601_30-Aug-85_d.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- FOSTER, T.P. (1998): Protein/peptide veterinary formulations. In: HARDEE, G.E., BAGGOT, J.D. (Szerk.): *Development and formulation of veterinary dosage forms*. New York, USA: Marcel Dekker, pp. 231-283.
- FOY, C.L. (1987): Adjuvants: Terminology, classification, and mode of action. In: CHOW, P.N.P., GRANT, C.A., HINSHALWOOD, A.M., SIMUNDSON, E. (Szerk.): *Adjuvants and agrochemicals*. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 1-15.
- FRANZ, J.E. (1985): Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E., ATKINSON, D. (Szerk.): *The herbicide glyphosate*. Toronto, USA: Butterworth and Co. Ltd., 490 pp.
- FRASCO, M.F., GUILHERMINO, L. (2002): Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**, 149-156.

- FREEMAN, C., CHAPMAN, P.J., GILMAN, K., LOCK, M.A., REYNOLDS, B., WHEATHER, H.S. (1995): Ion exchange mechanisms and the entrapment of nutrients by river biofilms. *Hydrobiologia*, **297**, 61-65.
- FRYDAY, S., TIEDE, K., STEIN, J. (2015): Scientific services to support EFSA systematic reviews: Lot 5 Systematic literature review on the neonicotinoids (namely active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid) and the risks to bees. *EFSA Supporting Publications*, **12**, EN-756.
- FVM (2009): Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium 61/2009. (V. 14.) FVM rendelet az Európai Mezőgazdasági Vidékfejlesztési Alapból nyújtott agrár-környezetgazdálkodási támogatások igénybevételének részletes feltételeiről. <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0900061.fvm>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- GARRETT, T.R., BHAKOO, M., ZHANG, Z. (2008): Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, **18**, 1049-1056.
- GHASSEMI, M., FARGO, L., PAINTER, P., PAINTER, P., QUINLIVAN, S., SCOFIELD, R., TAKATA, A. (1981): Environmental fates and impacts of major forest use pesticides. Washinton DC, USA: US Environmental Protection Agency, pp. A149-169.
- GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K.R. (2000): Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **167**, 35-120.
- GIROLAMI, V., MAZZON, L., SQUARTINI, A., MORI, N., MARZARO, M., Di BERNARDO, A., GREATTI, M., GIORIO, C., TAPPARO, A. (2009): Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology*, **102**, 1808-1815.
- GOLDSBOROUGH, L.G., BECK, A.E. (1989): Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **18**, 537-544.
- GOLDSBOROUGH, L.G., BROWN, D.J. (1993): Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 1139-1147.
- GOMES, M.P., JUNEAU, P. (2016): Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *Environmental Pollution*, **218**, 402-409.
- GOMES, M.P., LE MANACH, S.G., MACCARIO, S., LABRECQUE, M., LUCOTTE, M., JUNEAU, P. (2016): Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **130**, 65-70.

- GOMES, M.P., JUNEAU, P. (2017): Temperature and light modulation of herbicide toxicity on algal and cyanobacterial physiology. *Frontiers in Environmental Science*, **5**, 50.
- GOMES, M.P., LE MANACH, S.G., HÉNAULT-ETHIER, L., LABRECQUE, M., LUCOTTE, M., JUNEAU, P. (2017): Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 207.
- GONZALEZ, D., JUÁREZ, A.B., KRUG, C.P., SANTOS, M., VERA, S.M. (2019): Freshwater periphyton response to technical-grade and two commercial formulations of glyphosate. *Ecologia Austral*, **29**, 020-027.
- GONZÁLEZ-MAZO, E., HONING, M., BARCELÓ, D., GÓMEZ PARRA, A. (1997): Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spray mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, **31**, 504-510.
- GOULSON, D. (2013): REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, **50**, 977-987.
- GOWER, S.A., LOUX, M.M., CARDINA, J., HARRISON, S.K. (2002): Effect of planting date, residual herbicide, and postemergence application timing on weed control and grain yield in glyphosate-tolerant corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, **16**, 488-494.
- GRAHAM, L.E., WILCOX, L.W. (2000): Algae. Upper Saddle River, USA: Prentice-Hall, Inc., pp. 1-544.
- GRUIZ, K., HORVÁTH, B., MOLNÁR, M. (2001): Környezettoxikológia. Budapest: Műegyetem Kiadó, pp. 5-35.
- GUASCH, H., IVORRA, N., LEHMANN, V., PAULSSON, M., REAL, M., SABATER, S. (1998): Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *Journal of Applied Phycology*, **10**, 203-213.
- GUILHERMINO, L., LOPES, M.C., CARVALHO, A.P., SOARES, A.M.V.M. (1996): Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**, 979-985.
- GUIRY, M.D. (2012): How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, **48**, 1057-1063.
- GUPTA, R.C., MILATOVIĆ D. (2014): Insecticide. In: GUPTA, R.C. (Szerk.): *Biomarkers in toxicology*. Cambridge, USA: Academic Press, pp. 389-407.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130-7139.

- HAITH, D.A. (2010): Ecological risk assessment of pesticide runoff from grass surfaces. *Environmental Science and Technology*, **44**, 6496-6502.
- HANKE, I., SINGER, H., HOLLENDER, J. (2008): Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 2134-2135.
- HANKE, I., WITTMER, I., BISCHOFBERGER, S., STAMM, C., SINGER, H. (2010): Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, **81**, 422-429.
- HANSCH, C., LEO, A., HOEKMAN, D. (1995): Exploring QSAR -Hydrophobic, electronic, and steric constants. Washington DC, USA: American Chemical Society, pp. 262-431.
- HAYASAKA, D., KORENAGA, T., SUZUKI, K., SAITO, F., SÁNCHEZ-BAYO, F., GOKA, K. (2012): Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **80**, 355-362.
- HAYASAKA, D., SUZUKI, K., NOMURA, T., NISHIYAM, M., NAGAI, T., SÁNCHEZ-BAYO, F., GOKA, K. (2013): Comparison of acute toxicity of two neonicotinoid insecticides, imidacloprid and clothianidin, to five cladoceran species. *Journal of Pesticide Science*, **38**, 44-47.
- HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., JOWSEY, I.R. (2005): Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 51-88.
- HILL, W. (1996): Effects of light. In: STEVENSON, R.J., BOTHWELL, M.L., LOWE, R.L. (Szerk.): *Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems*. San Diego, USA: Academic Press, pp. 121-148.
- HOVE-JENSEN, B., ZECHEL, D.L., JOCHIMSEN, B. (2014): Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **78**, 176-197.
- IGLESIAS, A., NEBOT, C., MIRANDA, J.M., VÁZQUEZ, B.I., ABUÍN, C.M., CEPEDA, A. (2014): Determination of the presence of three antimicrobials in surface water collected from urban and rural areas. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**, 2367-2377.
- IHS MARKIT (2018): Surfactants. <https://ihsmarkit.com/products/chemical-surfactants-scup.html>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.

- IKUNO, E., MATSUMOTO, T., OKUBO, T., ITOI, S., SUGITA, H. (2008): Difference in the sensitivity to chemical compounds between female and male neonates of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology: An International Journal*, **23**, 570-575.
- ISO (1992): ISO 10260:1992 Water Quality - Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration. Geneva: International Organization for Standardization, 6 pp.
- ISO (2012a): ISO 6341:2012: Water Quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia Magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Geneva: International Organization for Standardization, 22 pp.
- ISO (2012b): ISO 8692:2012: Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. Geneva: International Organization for Standardization, 21 pp.
- IUMMATO, M.M., SABATINI, S.E., CACCIATORE, L.C., COCHÓN, A.C., CATALDO, D., DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA, M., JUÁREZ, Á.B. (2018): Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **163**, 69-75.
- JALAL, A., OLIVEIRA JUNIOR, J.C. DE, RIBEIRO, J.S., FERNANDES, G.C., MARIANO, G.G., TRINDADE, V.D.R., DOS REIS, A.R. (2021): Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **207**, 111225.
- JELENIK-NIKOLICS, M., LÉVAI, T. (2000): Biofilmek vízellátó rendszerekben. *Gyógyszerészet*, **44**, 621-624.
- JEMEC, A., TISLER, T., DROBNE, D., SEPCIC, K., FOURNIER, D., TREBSE, P. (2007): Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **68**, 1408-1418.
- JESCHKE, P., NAUEN, R., SCHINDLER, M., ELBERT, A. (2011): Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 2897-2908.
- JIA, F., YANG, Q., LIU, X., LI, X., LI, B., ZHANG, L., PENG, Y. (2017): Stratification of extracellular polymeric substances (EPS) for aggregated anammox microorganisms. *Environmental Science and Technology*, **51**, 3260-3268.
- JOHANSSON, C.H., JANMAR, L., BACKHAUS, T. (2014): Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. *Aquatic Toxicology*, **156**, 248-258.
- JONES, G.W., ISAACSON, R.E. (1983): Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **10**, 229-260.

- JOUX-ARAB, L., BERTHET, B., ROBERT, J.M. (2000): Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom *Haslea ostrearia*? *Marine Biology*, **136**, 323-330.
- JUNG, J., KIM, Y., KIM, J., JEONG, D.-H., CHOI, K. (2008): Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, **17**, 37-45.
- JURADO, E., FERNÁNDEZ-SERRANO, M., LECHUGA, M., RÍOS, F. (2011): Environmental impact of ether carboxyl derivative surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, **15**, 1-7.
- JURADO, E., FERNÁNDEZ-SERRANO, M., NÚÑEZ-OLEA, J., LECHUGA, M., JIMÉNEZ, J.L., RÍOS, F. (2012): Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: a comparative study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **88**, 290-295.
- JYOTHI, K., KRISHNA PRASAD, M., MOHAN NARASIMHA RAO, G. (2016): Algae in fresh water ecosystem. *Phykos*, **46**, 25-31.
- KAHLERT, M., McKIE, B.G. (2014): Comparing new and conventional methods to estimate benthic algal biomass and composition in freshwaters. *Environmental Science: Processes and Impacts*, **16**, 2627-2634.
- KAUTSKY, H., HIRSCH, A. (1931): Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*, **19**, 964.
- KAWAI, M., IWAMURO, Y., IIO-ISHIMARU, R., CHINAKA, S., TAKAYAMA, N., HAYAKAWA, K. (2011): Analysis of phosphorus-containing amino acid-type herbicides by sheathless capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometry using a high sensitivity porous sprayer. *Analytical Sciences*, **27**, 857-860.
- KEUM, Y.S., KIM, J.-H., LI, Q.X. (2013): Biomarkers and Metabolomics, Evidence of Stress. In: LAWS, E.A. (Szerk.): *Environmental toxicology - Selected entries from the encyclopedia of sustainability science and technology*. New York: Springer-Verlag, pp. 71-92.
- KIM, Y., CHOI, K., JUNG, J., PARK, S., KIM, P.-G., PARK, J. (2007): Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, **33**, 370-375.
- KIM, J., PARK, Y., CHOI, K. (2009): Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquatic Toxicology*, **91**, 87-94.

- KISS K.T. (1998): Bevezetés az algológiába. Elméleti és gyakorlati ismeretek. Budapest: ELTE Eötvös Kiadó, 283 pp.
- KJAER, J., OLSEN, P., ULLUM, M., GRANT, R. (2005): Leaching of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. *Journal of Environmental Quality*, **34**, 608-620.
- KLINK, P.R., FERGUSON, T.H., MAGRUDER, J.A. (1998): Formulation of veterinary dosage forms. In: HARDEE, G.E., BAGGOT, J.D. (Szerk.): *Development and formulation of veterinary dosage forms*. New York, USA: Marcel Dekker, pp. 145-231.
- KNEPPER T.P., BERNA J.L. (2003): Surfactants: properties, production and environmental aspects. *Comprehensive Analytical Chemistry*, **40**, 1-49.
- KNOCHE, M. (1994): Organosilicone surfactant performance in agricultural spray application - a review. *Weed Research*, **34**, 221-239.
- KOBAYASHI, T., SUEHIRO, F., TUYEN, B.C., SUZUKI, S. (2007): Distribution and diversity of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins in Mekong river sediments in Vietnam. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**, 729-737.
- KOEMAN, J.H., KÖHLER-GÜNTHER, A., KURELEC, B., RIVIÉRE, J.L., VERSTEEG, D., WALKER, C.H. (1993): Applications and objectives of biomarker research. In: PEAKALL D.B., SHUGART, L.R. (Szerk.): *Biomarkers; Research and application in the assessment of environmental health*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-13.
- KOLAR, B., ARNUS, L., JERETIN, B., GUTMAHER, A., DROBNE, D., DURJAVA, M.K. (2014): The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. *Chemosphere*, **115**, 75-80.
- KOLLMAYER, W.D., FLATTUM, R.F., FOSTER, J.P., POWELL, J.E., SCHROEDER, M.E., SOLOWAY, S.B. (1999): Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. In: YAMAMOTO, I., CASIDA, J. (Szerk.) *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 71-89.
- KRAMER, W., SCHIRMER, U. (2007): DE-175 (Spinetoram), a new semi-synthetic spinosyn in development. In: KRAMER, W., SCHIRMER, U. (Szerk.): *Modern crop protection compounds*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 1013-1031.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E. (1984): Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II: Interpretation of fluorescence signal. *Photosynthesis Research*, **5**, 139-157.
- KRISKA, GY. (2004): Élő Világ Könyvtár, Vízi gerinctelenek. Budapest: Kossuth Kiadó Zrt., 112 pp.

- KROGH, K.A., HALLING-SORENSEN, B., MOGENSEN, B.B., VEJRUP, K.V. (2003): Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere*, **50**, 871-901.
- KUMAR, A. (2018): Global Markets for Surfactant Chemicals and Materials. Wellesley, USA: BBC Research LLC., 11 pp.
- KUMAR, H.D., SINGH, H.N. (1979): Chlorophyta. In: KUMAR, H.D., SINGH, H.N. (Szerk.): *A textbook on algae*. London: Palgrave, pp. 69-122.
- KÜSTERS, M., GERHARTZ, M. (2010): Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin. *Journal of Separation Science*, **33**, 1139-1146.
- KVVM-EÜM-FVM (2009): Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium - Egészségügyi Minisztérium - Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről. <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0900006.kvv>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- KYLIN, H. (2013): Time-integrated sampling of glyphosate in natural waters. *Chemosphere*, **90**, 1821-1828.
- LAM, M.W., MABURY, S.A. (2005): Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences*, **67**, 177-188.
- LARA-MARTÍN, P.A., GÓMEZ-PARRA, A., KÖCHLING, T., SANZ, J.L., AMILS, R., GONZÁLEZ-MAZO, E. (2007): Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonates in coastal marine sediments. *Environmental Science and Technology*, **41**, 3573-3579.
- LARSEN, K., NAJLE, R., LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G. (2012): Effects of sublethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **34**, 811-818.
- LARSSON, D.G.J., DEPEDRO, C., PAXEUS, N. (2007): Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, **148**, 751-755.
- LAWRENCE, M.J. (1994): Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vesicles for drug delivery. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **19**, 257-270.
- LAWRENCE, J.R., KOPF, G., HEADLEY, J.V., NEU, T.R. (2001): Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**, 634-641.

- LAWRENCE, J.R., ZHU, B., SWERHONE, G.D.W., ROY, J., WASSENAAR, L.I., TOPP, E., KORBER, D.R. (2009): Comparative microscale analysis of the effects of triclosan and triclocarban on the structure and function of river biofilm communities. *Science of the Total Environment*, **407**, 3307-3316.
- LAW, R.J., ELLIOTT, A., THACKERAY, S.J. (2014): Do functional or morphological classifications explain stream phyto-benthic community assemblages? *Diatom Research*, **29**, 309-324.
- LEAR, G. (2016): Biofilms and bioremediation: Current research in emerging technologies. Haverhill: Caister Academic Press, 262 pp.
- LEBLANC, G.A, COCHRAN, B.J. (1985): Modulation of substrate-specific glutathione S-transferase activity in *Daphnia magna* with concomitant effects on toxicity tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, **82**, 37-42.
- LEMING, D. (2009): Eucarol AGE: Alkyl polyglucoside esters from Lamberti. <https://www.scribd.com/document/11647977/Eucarol-AGE-Alkyl-Polyglucoside-Esters-from-Lamberti>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- LENK, S., GÁDOROS, P., KOCSÁNYI, L., BARÓCSI, A. (2016): Teaching laser-induced fluorescence of plant leaves. *European Journal of Physics*, **37**.
- LEWANDOWSKI, Z., STOODLEY, P., ALTOBELLI, S., FUKUSHIMA, E. (1994): Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems - recent advances and new problems. *Water Science and Technology*, **31**, 153-162.
- LEWIS, K.A., TZILIVAKIS, J., WARNER, D. AND GREEN, A. (2016): An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, **22**, 1050-1064.
- LEWIS, P.A., WEBER, C.I. (1985): A study of the reliability of *Daphnia magna* acute toxicity test. In: CARDWELL, R.D., PURDY, R. BAHNER-COMOTTO, R. (Szerk.): *Aquatic toxicology and hazard assessment*. Philadelphia, USA: ASTM publication, pp. 73-86.
- LIFEWATCH BELGIUM (2020): DiatomBase. <http://www.diatombase.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149380>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- LIPOK, J., STUDNIK, H. GRUYAERT, S. (2010): The toxicity of Roundup 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 1681-1688.

- LISEC (1989): Alga, growth inhibition test. Effect of MON 2139 on the growth of *Selenastrum capricornutum*. Monsanto unpublished study XX-89-093. Bokrijk: LISEC, Study Centre for Ecology and Forestry.
- LISKA, I., WAGNER, F., SENGL, M., DEUTSCH, K., SLOBODNIK, J. (2015): Joint Danube Survey 3 – A comparative analysis of Danube water quality. Vienna: International Commission for the Protection of the Danube River, pp. 100-110.
- LIU, K., XU, S., ZHANG, M., KOU, Y., ZHOU, X., LUO, K., HU, L., LIU, X., LIU, M., BAI, L. (2016): Estimation of the toxicity of sulfadiazine to *Daphnia magna* using negligible depletion hollow-fiber liquid-phase microextraction independent of ambient pH. *Scientific Reports*, **6**, Article ID: 39798.
- LI, Y.H., HANNA, M.H., SVENSÄTER, G., ELLEN, P.R., CVITKOVITCH, D.G. (2001): Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *Journal of Bacteriology*, **183**, 6875-6884.
- LI, Z., LU, G., YANG, X., WANG, C. (2012): Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Ecotoxicology*, **21**, 353-361.
- LI, M., DU, F., CAO, C., LI, B., ZHAI, X. (2016): Effect of *glyphosate* isopropylamine on the surface tension and surface dilational rheology properties of polyoxyethylene tallow amine surfactant. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **37**, 213-221.
- LOCK, M.A. (1993): Attached microbial communities in rivers. In: FORD, T.E. (Szerk.): *Aquatic microbiology: An ecological approach*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, pp. 113-138.
- LOUREIRO, S., SVENDSEN, C., FERREIRA, A.L.G., PINHEIRO, C., RIBERIO, F., SOARES, A.M.V.M. (2010): Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**, 1716-1726.
- LOZANO, V.L., VINOCUR, A., SABIO y GARCÍA, C.A., ALLENDE, L., CRISTOS, D.S., ROJAS, D., WOLANSKY, M., PIZARRO, H. (2018): Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **148**, 1010-1019.
- LU, G., YANG, X., LI, Z., ZHAO, H., WANG, C. (2013): Contamination by metals and pharmaceuticals in northern Taihu Lake (China) and its relation to integrated biomarker response in fish. *Ecotoxicology*, **22**, 50-59.
- MA, J., QIN, W., LU, N., WANG, P., HUANG, C., XU, R. (2005): Differential sensitivity of three cyanobacteria (*Anabaena flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* and *Mirocystis*

- aeruginosa* to 10 pesticide adjuvants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **75**, 873-881.
- MACBEAN, C. (2012): The Pesticide Manual. 16th ed. Brighton: British Crop Production Council, 1440 pp.
- MACHOVICH, R. (2006): A nukleotidok anyagcseréje. In: ÁDÁM, V. (Szerk.): *Orvosi biokémia*. Budapest: Medicina, pp. 269-296.
- MACK, W.N., ANDERSON, A.O. (1975): Microbial film development in a trickling filter. *Microbial Ecology*, **2**, 215-226.
- MADSEN, T., PETERSEN, G., SEIERO, C., TORSLOV, J. (1996): Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate. *Journal of America Oil Chemistry Society*, **73**, 929-933.
- MADSEN, T., BOYD, H.B., NYLEN, D., PEDERSEN, A.R., PETERSEN, G.I., SIMONSEN, F. (2001): Environmental and health assessment of substances in household detergents and cosmetic detergent products. <https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-596-9/pdf/87-7944-597-7.pdf>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- MAGBANUA, F.S., TOWNSEND, C.R., HAGEMAN, K.J., LANGE, K., LEAR, G., LEWIS, G.D., MATTHAEI, C.D. (2013): Understanding the combined influence of fine sediment and glyphosate herbicide on stream periphyton communities. *Water Research*, **47**, 5110-5120.
- MAGES, M., OVÁRI, M., Von TÜMPLING, W.J., KRÖPFL, K. (2004): Biofilms as bio-indicator for polluted waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**, 1095-1101.
- MAGUIRE, R.J., WONG, P.T.S., RHAMEY, J.S. (1984): Accumulation and metabolism of tri-n-butyltin cation by a green alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41**, 537-540.
- MAHAI, G., WAN, Y., XIA, W., YANG, S., HE, Z., XU, S. (2019): Neonicotinoid insecticides in surface water from the central Yangtze River, China. *Chemosphere*, **229**, 452-460.
- MAJZIK-SOLYMOS, E., VISI, E., KÁROLY, G., BEKE-BERCZI, B., GYÖRFI, L. (2001): Comparison of extraction methods to monitor pesticide residues in surface water. *Journal of Chromatographic Science*, **39**, 325-331.
- MAKI, A.W., BISHOP, W.E. (1979): Acute toxicity studies of surfactants to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **8**, 8399-8612.
- MARDIANA-JANSAR, K., ISMAIL, B.S. (2014): Residue determination and levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with oil palm plantation in Tasik Chini, Pahang, Malaysia. *AIP Conference Proceedings*, **1614**, 795.

- MARGOUM, C., MORIN, S., MAZZELLA, N. (2015): Potential toxicity of pesticides in freshwater environments: passive sampling, exposure and impacts on biofilms: the PoToMAC project. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 3985-3987.
- MARSHALL, K.C. (1992): Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American Society for Microbiology News*, **58**, 202-207.
- MARTINEZ, R.S., DI MARZIO, W.D., SÁENZ M.E. (2015): Genotoxic effects of commercial formulations of chlorpyrifos and tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology*, **24**, 45-54.
- MATTSON, M.P. (2007): Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, **7**, 1-7.
- MCALLISTER, W., FORBIS, A. (1978): Acute toxicity of technical glyphosate (AB-78-201) to *Daphnia magna*.
<https://archive.epa.gov/pesticides/chemicalsearch/chemical/foia/web/pdf/103601/103601-1985-08-30b.pdf>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- MCCORMICK, P.V., CAIRNS, J. (1994): Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology*, **6**, 509-526.
- MCEL RATH, M.J. (1995): Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Seminars in Cancer Biology*, **6**, 375-385.
- MCLOUGHLIN, N., YIN, D., MALTBY, L., WOOD, R.M., YU, H. (2000): Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 2085-2092.
- MELNICHUK, S.D., SHERBAN, E.P., LOKHANSKAYA, V.I. (2007): Estimation of toxicity of glyphosate-based herbicides by biotesting method using cladocera. *Hydrobiological Journal*, **43**, 80-91.
- MENDEL, N., DZIAKAN, N., KARLIK, W., ANTONIADOU, M., CHLOPECKA, M. (2015): Acute toxicity of sulfamethoxazole and timethoprim mixtures on *Daphnia magna*. *Toxicology Letters*, **238**, S349.
- MENSINK, H., JANSSEN, P. (1994): Glyphosate.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- MERCKLE GMBH (2014): Cotrim E-ratiopharm.
[https://deputyprimeministercms.gov.mt/en/poyc/Documents/cotrim%20E%20ratiopharm%20480mg%20per%205ml%20soft_uk%20\(2\).pdf](https://deputyprimeministercms.gov.mt/en/poyc/Documents/cotrim%20E%20ratiopharm%20480mg%20per%205ml%20soft_uk%20(2).pdf). Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- MESNAGE, R., BERNAY, B., SÉRALINI, G.-E. (2013a): Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, **313**, 122-128.
- MESNAGE, R., CLAIR, E., GRESS, S., THEN, C., SZÉKÁCS, A., SÉRALINI, G.-E. (2013b): Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *Journal of Applied Toxicology*, **33**, 695-699.

- MESNAGE, R., DEFARGE, N., DE VENDÔMOIS, J.S., SÉRALINI G.-E. (2014): Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Research International*, **2014**, Article ID 179691.
- MESNAGE, R., ANTONIOU, M.N. (2017): Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Frontiers in Public Health*, **5**, 316.
- MESNAGE, R., ANTONIOU, M.N. (2018): Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticide. *Frontiers in Public Health*, **5**, 361.
- MESNAGE, R., BENBROOK, C., ANTONIOU, M.N. (2019): Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology*, **128**, 137-145.
- MOLDOVEANU, S., DAVID, V. (2017): Basic Information Regarding the HPLC Techniques In: MOLDOVEANU, S., DAVID, V. (Szerk.): *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. Amsterdam: Elsevier, pp. 87-187.
- MONSANTO EUROPE S.A. (2015): Biztonsági adatlap – Roundup Classic: Antwerp: Monsanto Europe S.A./ N.V.
- MORIN, S., DUONG, T.T., HERLORY, O., FEURTET-MAZEL, A., COSTE, M. (2008): Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**, 173-186.
- MORIN, S., GÓMEZ, N., TORNÉS, E., LICURSI, M., ROSEBERY, J. (2016): Benthic diatom monitoring and assessment of freshwater environments: standard methods and future challenges. In: ROMANÍ, A.M., GUASCH, H., BALAGUER, M.D. (Szerk.): *Aquatic biofilms: Ecology, water quality and wastewater treatment*. Haverhill: Caister Academic Press, pp. 111-124.
- MORRISSEY, C.A., MINEAU, P., DEVRIES, J.H., SÁNCHEZ-BAYO, F., LIESS, M., CAVALLARO, M.C., LIBER, K. (2015): Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International*, **74**, 291-303.
- MÖRTL, M., NÉMETH, G., JURACSEK, J., DARVAS, B., KAMP L., RUBIO, F., SZÉKÁCS, A. (2013): Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchemical Journal*, **107**, 143-151.
- MÖRTL, M., KERÉKI, O., DARVAS, B., KLÁTYIK, SZ., VEHOVSZKY, Á., GYÖRI, J., SZÉKÁCS A. (2016): Study on soil mobility of two neonicotinoid insecticides. *Journal of Chemistry*, **2016**, 1-9.

- MÖRTL, M., DARVAS, B., VEHOVSZKY, Á., GYŐRI, J., SZÉKÁCS, A. (2017): Occurrence of neonicotinoids in guttation liquid of maize – soil mobility and cross-contamination. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **97**, 868-884.
- MÖRTL, M., DARVAS, B., VEHOVSZKY, Á., GYŐRI, J., SZÉKÁCS, A. (2019): Contamination of the guttation liquid of two common weeds with neonicotinoids from coated maize seeds planted in close proximity. *Science of the Total Environment*, **649**, 1137-1143.
- MÖRTL, M., VEHOVSZKY, Á., KLÁTYIK, SZ., TAKÁCS, E., GYŐRI, J., SZÉKÁCS, A. (2020): Neonicotinoids: spreading, translocation and aquatic toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17**, 1-24.
- MURANISHI, S. (1990): Absorption enhancers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **7**, 1-33.
- MUSKÓ, I.B., GÖRÖG, SZ. (2000): Természetes alzatok benépesülési dinamikája a Balatonban, különös tekintettel az *Amphipoda* rákokra. Módszer és előzetes eredmények. *Hidrológiai Közlöny*, **80**, 278-281.
- NASELLI-FLORES, L., BARONE, R. (2009): Green algae. In: *Encyclopedia of inland waters*. Cambridge, USA: Academic Press, pp. 166-173.
- NÉBIH (2021a): Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal: Magyarországon engedélyezett állatgyógyászati készítmények. <https://atiportal.nebih.gov.hu/moengallatgykesz.html>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- NÉBIH (2021b): Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal: Állatgyógyászati készítmények és termékek listái / Lists of veterinary medicinal products. <https://portal.nebih.gov.hu/adatbazisok-allat>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- NÉBIH (2021c): Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal: Növényvédő szerek adatbázisa. <https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/kereso>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- NEDELKOSKA, T.V., LOW, G.K.-C. (2004): High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta*, **511**, 145-153.
- NIE, X.-P., LIU, B.-Y., YU, H.-J., LIU, W.-Q., YANG, Y.-F. (2013): Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Pollution*, **172**, 23-32.
- OECD (2004): Organisation for Economic Co-operation and Development Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test. Paris: OECD Publishing, 12 pp.

- OECD (2006): Organisation for Economic Co-operation and Development Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Paris: OECD Publishing, 25 pp.
- OECD (2012): Organisation for Economic Co-operation and Development Test No. 211: *Daphnia magna* reproduction test. Paris: OECD Publishing, 25 pp.
- OLIN, S.J., BARTGES, J.W. (2015): Urinary tract infections: Treatment/Comparative therapeutics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **45**, 721-746.
- OSTERREICHER-RAVID, D., RON, E.Z., ROSENBERG, E. (2000): Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. *Environmental Microbiology*, **2**, 366-372.
- PAERL, H.W., OTTEN, T.G. (2013): Harmful cyanobacterial blooms: Causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, **65**, 995-1010.
- PANIZZI, S., SUCIU, N.A., TREVISAN, M. (2017): Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Science of the Total Environment*, **580**, 136-146.
- PAPIS, E., DAVIES, S.J., JHA, A.N. (2011): Relative sensitivity of fish and mammalian cells to the antibiotic, trimethoprim: cytotoxic and genotoxic responses as determined by neutral red retention, Comet and micronucleus assays. *Ecotoxicology*, **20**, 208-217.
- PARK, S., CHOI, K. (2008): Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, **17**, 526-538.
- PASSY, S.I. (2007a): Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany*, **86**, 171-178.
- PASSY, S.I. (2007b): Community analysis in stream biomonitoring: what we measure and what we don't. *Environmental Monitoring and Assessment*, **127**, 409-417.
- PAVLIC, Z., VIDA KOVIC-CIFREK, Z., PUNTARIC, D. (2005): Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere*, **61**, 1061-1068.
- PENA, A., RODRÍGUEZ-LIÉBANA, J.A., MINGORANCE, M.D. (2011): Persistence of two neonicotinoid insecticides in wastewater, and in aqueous solutions of surfactants and dissolved organic matter. *Chemosphere*, **84**, 464-470.
- PEREIRA, J., ANTUNES, S.C., CASTRO, B.B., MARQUES, C.R., GONCALVES, A.M.M., GONCALVES, F., PEREIRA, R. (2009): Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, **18**, 455-463.

- PÉREZ G.L., TORREMORELL, A., MUGNI, H., RODRÍGUEZ, P., VERA M.S., DO NASCIMENTO, M., ALLENDE, L., BUSTINGORRY, J., ESCARAY, R., FERRARO, M., IZAGUIRRE, I., PIZARRO, H., BONETTO, C., MORRIS, D.P., ZAGARESE, H. (2007): Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, **17**, 2310-2322.
- PERJÉSI, P. (2014): Gyógyszermetabolizmus és gyógyyszertoxicitás. Pécs: Pécsi Tudományegyetem, pp. 109-114.
- PESCE, S., BATISSON, A., BARDOT, C., FAJON, C., PORTELLI, C., MONTUELLE, B., BOHATIER, J. (2009): Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 1905-1912.
- PETRI, A.W. (2006): Sulfonamides, trimethoprim–sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract. In: BRUNTON, L.L. (Szerk.): *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. p. 52.
- PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K.A., KRAUSE, E., CODD, G.A., STEINBERG, C.E.W. (1998): Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1425**, 527-533.
- PHARMINDEX (2021): SUMETROLIM 400 mg/80 mg tabletta. <https://www.pharminindex-online.hu/termekek/sumetrolim-400-mg80-mg-tabletta-1603>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- PORTER, R.S. (2011): The Merck manual of diagnosis and therapy. Kenilworth, USA: Merck & Co., Inc., 3786 pp.
- POWELL, H.A., KERBY, N.W., ROWELL, P. (1991): Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytologist*, **119**, 421-426.
- PPDB (2020): Pesticide Properties Database. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- PRIETRO, D.M., DEVESA-REY, R., RUBINOS, D.A., DIAZ-FIERROS, F., BARRAL, M.T. (2016): Biofilm formation on river sediments under different light intensities and nutrient inputs: A flume mesocosm study. *Environmental Engineering Science*, **33**, 250-260.
- PRINGLE, C.M. (1990): Nutrient spatial heterogeneity: effects on community structure, physiognomy, and diversity of stream algae. *Ecology*, **71**, 905-920.
- PROIA, L., OSORIO, V., SOLEY, S., KÖCK-SCHULMEYER, M., PEREZ, S., BARCELÓ, D., ROMANÍ, A.M., SABATER, S. (2013) Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river. *Environmental Pollution*, **178**, 220-228.

- QI, S., WANG, C., CHEN, X., QIN, Z., LI, X., WANG, C. (2013): Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **98**, 339-344.
- QIU, H., GENG, J., REN, H., XIA, X., WANG, X., YU, Y. (2013): Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of Hazardous Materials*, **172**, 248-249.
- RABY, M., NOWIERSKI, M., PERLOV, D., ZHAO, X., HAO, C., POIRIER, D.G., SIBLEY, P.K. (2018): Acute toxicity of six neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **37**, 1430-1445.
- RADKE, M., LUAWIGI, C., HEINKELE, G., MÜRDTER, T.E., LETZEL, M. (2009): Fate of the antibiotic sulfamethoxazole and its two major human metabolites in a water sediment test. *Environmental Science and Technology*, **43**, 3135-3141.
- RAMASAMY, P., ZHANG, X. (2005): Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Science and Technology*, **52**, 217-223.
- RASCH, A., HUNSCHE, M., MAIL, M., BURKHARDT, J., NOGA, G., PARIYAR, S. (2018): Agricultural adjuvants may impair leaf transpiration and photosynthetic activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **132**, 229-237.
- RELYEA, R.A. (2005): The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, **15**, 618-627.
- RELYEA, R.A. (2009): A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, **159**, 363-376.
- RENO, U., DOYLE, S.R., MOMO, F.R., REGALDO, L., GAGNETEN, A.M. (2018): Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. *Ecotoxicology*, **27**, 784-793.
- REN, Z., LI, Z., MA, M., WANG, Z., FU, R. (2009): Behavioral responses of *Daphnia magna* to stresses of chemicals with different toxic characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **82**, 310-316.
- RICO-MARTÍNEZ, R., ARIAS-ALMEIDA, J.C., PÉREZ-LEGASPI, I.A., ALVARADO-FLORES, J., RETES-PRUNEDA, J.L. (2012): Adverse effects of herbicides on freshwater zooplankton. In: HASANEEN, M.N. (Szerk.): *Herbicides - Properties, synthesis and control of weeds*. London: IntechOpen, pp. 405-434.
- RIERA, S.F., COHEN, R.A. (2016): Alkyl polyglucoside compound influences freshwater plankton community structure in floating field mesocosms. *Ecotoxicology*, **25**, 1458-1467.

- RIMET, F., BOUCHEZ, A. (2011): Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators*, **11**, 489-499.
- RIMET, F., BOUCHEZ, A. (2012): Life-forms, cell-sizes and ecological guilds of diatoms in European rivers. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, **406**, 01.
- RIMET, F., CHAUMEIL, P., KECK, F., KERMARREC, L., VASSELON, V., KAHLERT, M., FRANC, A., BOUCHEZ, A. (2016): R-Syst:: diatom: an open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. *Database*, **2016**, 1-21.
- RIMET, F., CHONOVA, T., GASSIOLE, G., GUSEV, E., KAHLERT, M., KECK, F., KELLY, M., KULIKOVSKIY, M., MALTSEV, Y., MANN, D., PFANNKUCHEN, M., TROBAJO, R., VASSELON, V., WETZEL, C., ZIMMERMANN, J., BOUCHEZ, A. (2018): Diat.barcode, an open-access barcode library for diatoms. https://www6.inrae.fr/carrtel-collection_eng/Barcoding-database. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- RIMET, F., GUSEV, E., KAHLERT, M., KELLY, M., KULIKOVSKIY, M., MALTSEV, Y., MANN, D., PFANNKUCHEN, M., TROBAJO, R., VASSELON, V., ZIMMERMANN, J., BOUCHEZ, A. (2019): Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports*, **9**, Article ID: 15116.
- RODRIGUEZ, S., BISHOP, P. (2008): Enhancing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effects of nonionic surfactant addition on biofilm function and structure. *Journal of Environmental Engineering*, **134**, 505-512.
- RODRIGUEZ-GIL, J.L., PROSSER, R., POIRIER, D., LISSEMORE, L., THOMPSON, D., HANSON, M., SOLOMON, K.R. (2017): Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: Species sensitivity distribution from laboratory acute exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **36**, 501-511.
- ROMANÍ, A.M. (2009): Freshwater biofilms. In: DÜRR, S., THOMASON, J.C. (Szerk.): *Biofouling*. Oxford: Wiley-Blackwell, pp. 137-153.
- RUBIO, F., VELDHUIS, L.J., CLEGG, B.S., FLEEKER, J.R., HALL, J.C. (2003): Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 691-696.
- RUEPPEL, M.L., BRIGHTWELL, B.B., SCHAEFER, J., MARVEL, J.T. (1977): Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25**, 517-528.

- SABLAYROLLES, C., MONTRÉJAUD-VIGNOLES, M., SILVESTRE, J., TREILHOU, M. (2009): Trace determination of linear alkylbenzene sulfonates: application in artificially polluted Soil - Carrots System. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2009**, 404836.
- SÁENZ, M.E., DI MARZIO, W. (2009): Ecotoxicity of herbicide glyphosate to four chlorophyceae freshwater algae. *Limnetica*, **28**, 149-158.
- SÁGI, GY., BEZSENYI, A., KOVÁCS, K., KLÁTYIK, SZ., DARVAS, B., SZÉKÁCS, A., MOHÁCSI-FARKAS, CS., TAKÁCS, E., WOJNÁROVITS, L. (2018): Radiolysis of sulfonamide antibiotics in aqueous solution: Degradation efficiency and assessment of antibacterial activity, toxicity and biodegradability of products. *Science of Total Environment*, **622-623**, 1009-1015.
- SAKAI, N., SHIRASAKA, J., MATSUI, Y., RAMLI, M.R., YOSHIDA, K., MOHD, M.A., YONEDA, M. (2017): Occurrence, fate and environmental risk of linear alkylbenzene sulfonate in the Langat and Selangor River basins, Malaysia. *Chemosphere*, **172**, 234-241.
- SÁNCHEZ-BAYO, F., TENNEKES, H.A., GOKA, K. (2013): Impact of systemic insecticides on organisms and ecosystems. In: TRDAN, S. (Szerk.): *Insecticides - Development of safer and more effective technologies*. London: IntechOpen, pp. 367-416.
- SÁNCHEZ-BAYO F., GOKA, K., HAYASAKA, D. (2016): Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, **4**, 71.
- SAUER, K., RICKARD, A.H., DAVIES, D.G. (2007): Biofilms and biocomplexity. *Microbe*, **2**, 347-353.
- SAXTON, M.A., MORROW, E.A., BOURBONNIERE, R.A., WILHELM, S.W. (2011): Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, **37**, 683-690.
- SCCAP (2020): Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa: Media recipes. <http://www.sccap.dk/media/>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- SCHAAFSMA, A., LIMAY-RIOS, V., BAUTE, T., SMITH, J., XUE, Y. (2015): Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in Southwestern Ontario. *PLoS One*, **10**, e0118139.
- SCHAFFER, J.D., SEBETICH, M.J. (2004): Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **72**, 1032-1037.

- SCHMITT-JANSEN, M., ALTENBURGER, R. (2005): Toxic effects of isoproturon on periphyton communities – a microcosm study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **62**, 539-545.
- SCHMUCK, R. (2001): Ecotoxicological profile of the insecticide thiacloprid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **54**, 161-184.
- SCHMUCK, R., STADLER, T., SCHMIDT, H.-W. (2003): Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, *Hymenoptera*). *Pest Management Science*, **59**, 279-286.
- SCHNURR, P.J., ALLEN, D.G. (2015): Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **52**, 418-429.
- SCHÖNHERR, J. (2002): A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across astomatous cuticular membranes. *Pest Management Science*, **58**, 343-351.
- SCHORER, M., EISELE, M. (1997): Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. *Water Air and Soil Pollution*, **99**, 651-659.
- SCOURFIELD, D.J., HARDING, J.P. (1958): A key to the British species of freshwater *Cladocera* with notes on their ecology. Ambleside: Freshwater Biological Association, pp. 1-55.
- SERVIZI, J.A., GORDON, R.W., MARTENS, D.W. (1987): Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and Trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**, 15-22.
- SEYDEL, J.K., WEMPE, E., MILLER, G.H., MILLER, L. (1972): Kinetics and mechanisms of action of trimethoprim and sulfonamides, alone or in combination, upon *Escherichia coli* (Part 1 of 2). *Chemotherapy*, **17**, 217-237.
- SHAW, L.E., MIBBAYAD, A. (2016): 2,4-D and glyphosate affect aquatic biofilm accrual, gross primary production, and community respiration. *AIMS Environmental Science*, **3**, 663-672.
- SIHTMAE, M., BLINOVA, I., KÜNNIS-BERES, K., KANARBIK, L., HEINLAAN, M., KAHRU, A. (2013): Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, **72**, 215-224.
- SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L.P., BONMATIN, J.M., CHAGNON, M., DOWNS, C., FURLAN, L., GIBBONS, D.W., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D.P., KRUPKE, C.H., LIESS, M., LONG, E., McFIELD, M., MINEAU, P., MITCHELL, E.A.D., MORRISSEY, C.A., NOOME, D.A., PISA, L., SETTELE, J., STARK, J.D., TAPPARO, A., Van DYCK, H.,

- Van PRAAGH J., Van der SLUIJS J.P., WHITEHORN, P.R., WIEMERS, M. (2015): Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 5-34.
- SOBRINO-FIGUEROA, A. (2018): Toxic effect of commercial detergents on organisms from different trophic levels. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 13283-13291.
- SONG, Y., CHENG, M., ZHOU, J. (2017): Effects of three pesticides on superoxide dismutase and glutathione-S-transferase activities and reproduction of *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Protection*, **43**, 80-86.
- SORENSEN, H., CEDERGREEN, N., SKOVGAARD, I.M., STREIBIG, J.C. (2007): An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics*, **14**, 383-397.
- SPATH, R., FLEMMING, H.-C., WUERTZ, S. (1998): Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology*, **37**, 207-210.
- SPECZIÁR, A. (2008): Life history patterns of *Procladius choreus*, *Tanypus punctipennis* and *Chironomus balatonicus* in Lake Balaton. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, **44**, 181-188.
- STANIER, R.Y., COHEN-BAZIRE, G. (1977): Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*, **31**, 225-274.
- STEBER, J., GUHL, W., STELTER, N., SCHRODER, F.R. (1995): Alkyl polyglycosides - ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside, Surfactants, Detergents*, **32**, 515-521.
- STENGER-KOVÁCS, C., LENGYEL, E., CROSSETTI, L.O., ÜVEGES, V., PADISÁK, J. (2012): Diatom ecological guilds as indicators of temporally changing stressors and disturbances in the small Torna-stream, Hungary. *Ecological Indicators*, **24**, 138-147.
- STEVENSON, R.J., LOWE, R.L. (1986): Sampling and interpretation of algal patterns for water quality assessment. In: ISOM, R.G. (Szerk.): *Rationale for sampling and interpretation of ecological data in the assessment of freshwater ecosystems*. Philadelphia, USA: American Society for Testing and Materials, pp. 118-149.
- STRUGER, J., THOMPSON, D., STAZNIK, B., MARTIN, P., MCDANIEL, T., MARVIN, C. (2008): Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **80**, 378-384.
- STRUGER, J., GRABUSKI, J., CAGAMPAN, S., SVERKO, E., MCGOLDRICK, D., MARVIN, C.H. (2017): Factors influencing the occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface waters of southern Ontario, Canada. *Chemosphere*, **169**, 516-523.

- SUKUL, P., SPITELLER, M. (2006): Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. In: WARE, G.W. (Szerk.): *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Vol. 187. New York, USA: Springer, pp. 67-101.
- SULEK, M.W., OGORZALEK, M., WASILEWSKI, T., KLIMASZEWSKA, E. (2013): Alkyl polyglucosides as components of water based lubricants. *Journal of Surfactants and Detergents*, **16**, 369-375.
- SULLIVAN, D.S., SULLIVAN, T.P., BISALPUTRA, T. (1981): Effects of Roundup herbicide on diatom populations in the aquatic environment of a coastal forest. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**, 91-96.
- SUMI AGRO HUNGARY (2014): Biztonsági adatlap – Mospilan 20 SG. <https://www.sumiagro.hu/wp-content/uploads/2021/03/Mospilan-biztonsagi-adatlap.pdf>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- SUROSZ, W., PALINSKA, K.A. (2005): Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **48**, 40-48.
- SUR, R., STORK, A. (2003): Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology*, **56**, 35-40.
- SUTHERLAND, I.W. (2001): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**, 3-9.
- SVIRIDOV, A.V., SHUSHKOVA, T.V., ERMAKOVA, I.T., IVANOVA, E.V., EPIKTETOV, D.O., LEONTIEVSKY, A.A. (2015): Microbial degradation of glyphosate herbicides. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **51**, 188-195.
- SWANN, M. (1969): Report joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. London: H.M. Stationery Office, 83 pp.
- SWENSON, E.S., CURATOLO, W.J. (1992): Means to enhance penetration: intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **8**, 39-92.
- SYNGENTA (2016): Biztonsági adatlap – Actara 240 SC. https://www.syngenta.ca/pdf/msds/Actara_240SC_28407_en_SDS.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- SYNGENTA (2018): Biztonsági adatlap – Medallon Premium. <https://www.syngenta.hu/sites/g/files/zhg316/f/medallon-premium-a12798qa-2018-januar-10-20180205.pdf?token=1517829000>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- SZÉKÁCS, A. (1999): A növényvédő szerek kockázatai. *Magyar Tudomány*, **44**, 38-49.

- SZÉKÁCS, A. (2006): Gyomirtó szerek. In: DARVAS, B., SZÉKÁCS, A. (Szerk.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. Budapest: L'Harmattan Kiadó, pp. 95-112.
- SZÉKÁCS, A. (2017): Mechanism-related teratogenic, hormone modulant and other toxicological effects of veterinary and agricultural surfactants. *Insights in Veterinary Science*, **1**, 024-031.
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2006): Talaj- és vízszennyező növényvédő szerek. In: DARVAS, B., SZÉKÁCS, A. (Szerk.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. Budapest: L'Harmattan Kiadó, pp. 269-277.
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2012): Forty years with glyphosate. In: Hasaneen, M.N. (Szerk.): *Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds*. London: IntechOpen, pp. 247-284.
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2018): Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science*, **6**, 78.
- SZÉKÁCS, A., MÖRTL, M., DARVAS, B. (2015): Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: Surveys in 1990–2015. *Journal of Chemistry*, **2015**, Article ID 717948.
- TABOR, C.F., BARBER, L.B. (1996): Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the Mississippi river. *Environmental Science and Technology*, **30**, 161-171.
- TAKADA, H., MUTOH, K., TOMITA, N., MIYADZU, T., OGURA, N. (1994): Rapid removal of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by attached biofilm in an urban shallow stream. *Water Research*, **28**, 1953-1960.
- TAXASERVICE (2020): Phycology Section: ecology and taxonomy of freshwater algae, particularly diatoms. https://diatom.ansp.org/taxaservice/ShowTaxon1.ashx?naded_id=1011. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- THERMO SCIENTTIFIC (2013): Product anual - Acclaim Surfactant Plus. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065530-Acclaim-Surfactant-Plus-Man065530-EN.pdf>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- THE SOAP KITCHEN (2020): Biztonsági adatlap – Plantapon LGC. <https://www.thesoapkitchen.co.uk/plantapon-lgc>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- TIEN, C.J., LIN, M.C., CHIU, W.H., CHEN, C.S. (2013): Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilm community structure. *Environmental Pollution*, **179**, 95-104.
- TOMIZAWA, M., CASIDA, J.E. (2005): Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 247-268.

- TÓTH, G., HÁHN, J., RADÓ, J., SZALAI, D.A., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2020): Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environmental Pollution*, **256**, 115027.
- TÓTH, R., MÉSZÁROS, I., FARSANG, A., ZÁDORI, Z. (2016): Az állatorvosi vakcinák adjuvánsainak hatásmechanizmusai. *Magyar Állatorvosok Lapja*, **138**, 31-46.
- TOUMI, H., BOUMAIZA, M., MILLET, M., RADETSKI, C.M., CAMARA, B.I., FELTEN, V., FERARD, J. (2015): Investigation of differences in sensitivity between 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean *Cladocera*) exposed to malathion (organophosphorous pesticide). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **50**, 34-44.
- TOWNSEND, M., PECK, C., MENG, W., HEATON, M., ROBISON, R., O'NEILL, K. (2017): Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **85**, 79-85.
- TRÁBERT, ZS., KISS, K.T., VÁRBÍRÓ, G., DOBOSY, P., GRIGORSZKY, I., ÁCS, É. (2017): Comparison of the utility of a frequently used diatom index (IPS) and the diatom ecological guilds in the ecological status assessment of large rivers. *Fundamental and Applied Limnology*, **189**, 87-103.
- TRANSPARENCY MARKET RESEARCH (2014): Global glyphosate market: Snapshot. <https://www.transparencymarketresearch.com/glyphosate-market.html>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- TRAVLOS, I., CHEIMONA, N., BILALIS, D. (2017): Glyphosate efficacy of different salt formulations and adjuvant additives on various weeds. *Agronomy*, **7**, 60.
- TSUI, M.T.K., CHU, L.M. (2003): Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, **52**, 1189-1197.
- TU, M., RANDALL, J.M. (2001): Chapter 8 – Adjuvants. In: TU, M., HURD, C., RANDALL, J.M. (Szerk.): *Weed control methods handbook*. Arlington, USA: The Nature Conservancy, pp. 1-25.
- TUSH, D., LOFTIN, K.A., MEYER, M.T. (2013): Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1319**, 80-87.
- UPPGARD L.-L., LINDGREN, A., SJÖSTRÖM, M., WOLD, S. (2000): Multivariate quantitative structure-activity relationships for the aquatic toxicity of alkyl polyglucosides. *Journal of Surfactants and Detergents*, **3**, 33-41.

- US EPA (1997): United States Environmental Protection Agency: Use of term “Inert” in the label ingredients statement. Pesticide Registration (PR) Notice 97-6. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington DC, USA: Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office, 3 pp.
- US EPA (2003): United States Environmental Protection Agency: Pesticide fact sheet, Clothianidin.
https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-044309_30-May-03.pdf. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- US EPA (2008): United States Environmental Protection Agency: Appendix J: Ecological effects data.
<https://www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/redleg-frog/glyphosate/appendix-j.pdf>. Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- VAN GINKEL, C.G., STROO, C.A., KROON, A.G.M. (1993): Biodegradability of ethoxylated fatty amines and amides and the non-toxicity of their biodegradation products. *Tenside Surfactants Detergents*, **30**, 213-216.
- VANOVERBEKE, J., DE GELAS, K., DE MEESTER L. (2007): Habitat size and the genetic structure of a cyclical parthenogen, *Daphnia magna*. *Heredity*, **98**, 419-426.
- VEHOVSZKY, Á., FARKAS, A., ÁCS, A., STOLIAR, O., SZÉKÁCS, A., MÖRTL, M., GYŐRI, J. (2015): Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquatic Toxicology*, **167**, 172-179.
- VENZMER, J. (2011): Superspreading - 20 years of physicochemical research. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **16**, 335-343.
- VERA, M.S., LAGOMARSINO, L., SYLVESTER, M., PÉREZ, G.L., RODRIGUEZ, P., MUGNI, H., SINISTRO, R., FERRARO, M., BONETTO, C., ZAGARES, H., PIZARRO, H. (2010): New evidence of Roundup (glyphosate formulation) impact on periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, **19**, 710-721.
- VERA, M.S., JUÁREZ, Á.B., PIZARRO, H.N. (2014): Comparative effects of technical-grade and a commercial formulation of glyphosate on the pigment content of periphytic algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **93**, 399-404.
- VERDONCK, F.A.M., SOUREN, A.F.M.M., VAN ASSELT, M.B.A., VAN SPRANG, P.A., VANROLLEGHEM, P.A. (2007): Improving uncertainty analysis in European Union risk assessment of chemicals. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **3**, 333-343.
- VERECKEN, H. (2005): Mobility and leaching of the glyphosate: a review. *Pest Management Science*, **61**, 1139-1151.

- VERGE, C., MORENO, A., BRAVO, J., BERNA, J.L. (2001): Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere*, **44**, 1749-1757.
- VIDYASHANKAR, S., RAVISHANKAR, G.A. (2016): Algae-based bioremediation: Bioproducts and biofuels for biobusiness. In: PRASAD, M.N.V. (Szerk.): *Bioremediation and bioeconomy*. Amsterdam: Elsevier, pp. 457-493.
- VILLEGAS-NAVARRO, A., ROSAS-L, E., REYES, J.L. (2003): The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, **136**, 127-134.
- VM (2010): Vidékfejlesztési Minisztérium 10/2010. (VIII. 18.) VM rendelet a felszíni víz vízszennyezettségi határértékeiről és azok alkalmazásának szabályairól. <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a1000010.vm> Lekérdezés időpontja: 2021.05.02.
- WALKER, C.H., SIBLY, R.M., HOPKIN, S.P., PEAKALL, D.B. (2012): Biomarkers. In: WALKER, C.H., SIBLY, R.M., HOPKIN, S.P., PEAKALL, D.B. (Szerk.): *Principles of Ecotoxicology*. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 173-188.
- WANGKARN, S., SOISUNGNOEN, P., RAYANAKORN, M., GRUDPAN, K. (2005): Determination of linear alkylbenzene sulfonates in water samples by liquid chromatography-UV detection and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, **67**, 686–695.
- WANG, C., LIN, X., LI, L., LIN, S. (2016): Differential growth responses of marine phytoplankton to herbicide glyphosate. *PLoS One*, **11**, e0151633.
- WANG, Z., XIAO, B., WU, X., YINGCAI, T., XIAOLEI, W., SONG, S.L. (2010): Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in water of Lake Dianchi - spatial and seasonal variation, and kinetics of biodegradation. *Environmental Monitoring and Assessment*, **171**, 501-512.
- WATSON, S.B., WHITTON, B.A., HIGGINS, S.N., PAERL, H.W. BROOKS, B.W., WEHR, J.D. (2015): Harmful algal blooms. In: WEHR, J.D., SHEATH, R.G., KOCIOLEK, P. (Szerk.): *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. Cambridge, USA: Academic Press, pp. 873-920.
- WHIGHAM, D.K., STOLLER, E.W. (1978): Soybean desiccation by paraquat, glyphosate, and ametryn to accelerate harvest. *Agronomy Journal*, **71**, 630-633.
- WHITE, G.F. (1995): Multiple interactions in riverine biofilms - surfactant adsorption, bacterial attachment and biodegradation. *Water Science and Technology*, **31**, 61-70.
- WINGENDER, J., NEU, T.R., FLEMMING, H.-C. (1999): Microbial extracellular polymeric substances. Characterization, structure and function. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-117.

- WOLFAARDT, G.M., LAWRENCE, J.R., ROBARTS, R.D., CALDWELL, D.E. (1998): *In situ* characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microbial Ecology*, **35**, 213-223.
- WOLLENBERGER, L., HALLING-SORENSEN, B., KUSK, K.O. (2000): Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **40**, 723-730.
- WONG, P. K. (2000): Effect of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, **41**, 177-182.
- WOODCOCK, B.A., BULLOCK, J.M., SHORE, R.F., HEARD, M.S., PEREIRA, M.G., REDHEAD, J., RIDDING, L., DEAN, H., SLEEP, D., HENRYS, P., PEYTON, J., HULMES, S., HULMES, L., SÁROSPATAKI, M., SAURE, C., EDWARDS, M., GENERSCH, E., KNÄBE, S., PYWELL, R.F. (2017): Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*, **356**, 1393-1395.
- WOOD, R.J., MITROVIC, S.M., LIM, R.P., KEFFORD, B.J. (2016): The influence of reduced light intensity on the response of benthic diatoms to herbicide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **35**, 2252-2260.
- WU, H.Y., XU, H.X., HONG, Y.B., ZHANG, J.F., WU, J.C. (2011a): The use of biomarkers in the antioxidant responses of *Daphnia magna* to the acute and chronic exposure to no. 20 diesel oil and 2,4-dichlorophenol. *Chemical Speciation and Bioavailability*, **23**, 80-87.
- WU, N., DONG, X., LIU, Y., WANG, C., BAATTRUP-PEDERSON, A., RIIS, T. (2017): Using river microalgae as indicators for freshwater biomonitoring: Review of published research and future directions. *Ecological Indicators*, **81**, 124-131.
- WU, S.-G., CHEN, L.-P., WU, C.-X., CANG, T., YU, R.-X., ZHAO, X.-P. (2011b): Acute toxicity and safety of four insecticides to aquatic organisms. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, **23**, 101-106.
- XIE, W., HAN, C., QIAN, Y., DING, H., CHEN, X., XI, J. (2011): Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 4426-4433.
- XU, P., HUANG, L. (2017): Stereoselective bioaccumulation, transformation, and toxicity of triadimefon in *Scenedesmus obliquus*. *Chirality*, **29**, 61-69.
- YÁNEZ, K.P., BERNAL, J.L., NOZAL, M.J., MARTÍN, M.T., BERNA, J. (2013): Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *Journal of Chromatography A*, **1285**, 110-117.

- YAMADA, T., TAKAHASHI, H., LLATANO, R. (1999): A novel insecticide, acetamiprid. In: YAMAMOTO, I., CASIDA, J.E. (Szerk.): *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Tokyo: Springer Japan, pp. 149-176.
- YU, Z., YIN, D., DENG, H. (2014): The combinational effects between sulfonamides and metals on nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **111**, 66-71.
- ZÁRAY, GY. (2018): Gyógyszermaradványok felszíni vizekben. *Magyar Tudomány*, **179**, 1376-1381.
- ZHANG, A., KAISER, H., MAIENFISCH, P., CASIDA, J.E. (2000): Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [³H]imidacloprid binding site. *Journal of Neurochemistry*, **75**, 294-1303.
- ZHANG, L., QIU, L., WU, H., LIU, X., YOU, L., PEI, D., CHEN, L., WANG, Q., ZHAO, J. (2012): Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **155**, 517-527.
- ZHANG, Y., WANG, F., ZHU, X., ZENG, J., ZHAO, Q., JIANG, X. (2015): Extracellular polymeric substances govern the development of biofilm and mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons for improved biodegradation. *Bioresource Technology*, **193**, 274-280.
- ZHANG, H., ZHAO L. (2017): Influence of sublethal doses of acetamiprid and halosulfuron-methyl on metabolites of zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic Toxicology*, **191**, 85-94.
- ZINNER, S.H., MAYER, K.H. (2015): 33 - Sulfonamides and trimethoprim. In: BENNETT, J.E., DOLIN, R., BLASER, M.J. (Szerk.): *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, USA: Saunders, pp. 410-418.
- ZIPPEL, B., NEU T.R. (2005): Growth and structure of phototrophic biofilms under controlled light conditions. *Water Science and Technology*, **52**, 203-209.

2. MELLÉKLET: PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Idegen nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

- Székács I., Fejes Á., **Klátyik Sz.**, Takács E., Patkó D., Pomóthy J., Mörtl M., Horváth R., Madarász E., Darvas B., Székács A. (2014): Environmental and toxicological impacts of glyphosate with its formulating adjuvant. *Int. J. Biol. Veter. Agric. Food Engineer.* **8**: 213-218.
- Mörtl M., Kereki O., Darvas B., **Klátyik Sz.**, Vehovszky Á., Győri J., Székács A. (2016): Study on soil mobility of two neonicotinoid insecticides. *J. Chem.* **2016**: Article ID 4546584. *IF*: 1,300
- Klátyik Sz.**, Bohus P., Darvas B., Székács A. (2017): Authorization and toxicity of veterinary drugs and plant protection products: residues of the active ingredients in food and feed and toxicity problems related to adjuvants. *Front. Vet. Sci.* **4**: 146. *IF*: 2,164
- Klátyik Sz.**, Takács E., Mörtl M., Földi A., Trábert Zs., Ács É., Darvas B., Székács A. (2017): Dissipation of the herbicide active ingredient glyphosate in natural water samples in the presence of biofilms. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **97**: 901-921. *IF*: 1,372
- Takács E., **Klátyik Sz.**, Mörtl M., Rácz G., Kovács K., Darvas B., Székács A. (2017): Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna* – the role of active ingredients and co-formulants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **97**: 885-900. *IF*: 1,372
- Sági Gy., Bezsenyi A., Kovács K., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Székács A., Mohácsi-Farkas Cs., Takács E., Wojnárovits L. (2018): Radiolysis of sulfonamide antibiotics in aqueous solution: Degradation efficiency and assessment of antibacterial activity, toxicity and biodegradability of products. *Sci. Total Environ.* **622-623**: 1009-1015. *IF*: 4,900
- Mörtl M., Takács E., **Klátyik Sz.**, Székács A. (2019): Aquatic toxicity and loss of linear alkylbenzenesulfonates alone and in a neonicotinoid insecticide formulation in surface water. *Sci. Total Environ.* **652**: 780-787. *IF*: 4,900
- Mörtl M., Vehovszky Á., **Klátyik Sz.**, Takács E., Győri J., Székács A. (2020): Neonicotinoids: spreading, translocation and aquatic toxicity. *Int. J. Environ. Public Health* **17**: 2006. *IF*: 3,127¹

¹ a folyóirat elmúlt 5 éves impakt faktorának átlagával számolva

Zaller, J.G., Weber, M., Maderthaner, M., Gruber, E., Takács, E., Mörtl, M., **Klátyik, Sz.**, Győri, J., Römbke, J., Leisch, F., Spangl, B., Székács A. (2021): Effects of glyphosate-based herbicides and their active ingredients on earthworms, water infiltration and glyphosate leaching are influenced by soil properties. *Env. Sci. Eur.* **33**: 51. IF: 5,394²

Idegen nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók:

Székács I., Fejes Á., **Klátyik Sz.**, Takács E., Patkó D., Pomóthy J., Mörtl M., Horváth R., Madarász E., Darvas B., Székács A. (2014): Environmental and toxicological impacts of glyphosate with its formulating adjuvant. *Abs. International Conference on Agricultural and Environmental Systems* (Miami, FL, USA), p. 213.

Klátyik Sz., Földi A., Ács É., Cséffán T., Pasaréti Gy., Mörtl M., Takács E., Bohus P., Székács A., Darvas B. (2015): Reaction of biofilms (cyanobacterial, diatom and green algae) from Lake Balaton and River Danube to herbicide preparation Roundup and its components (glyphosate, POEA). *Proceedings of the 21st International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), pp. 378-382.

Klátyik Sz., Mörtl M., Takács E., Székács A., Darvas B. (2016): Effects of neonicotinoid insecticide formulations and its components on *Daphnia magna*. *Abs. 9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the environment és 15th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides* (Santiago de Compostela, Spain), pp. 151-152.

Klátyik Sz., Trábert Zs., Ács É., Mörtl M., Takács E., Bohus P., Székács A., Darvas B. (2016): The effects of herbicide preparation Roundup and its components (glyphosate, POEA) on the algal communities of natural biofilms. *Abs. 9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the environment és 15th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides* (Santiago de Compostela, Spain), pp. 395-396.

Klátyik Sz., Sági Gy., Takács E., Kovács K., Wojnárovits L., Takács E., Darvas B., Székács A. (2017): Comparative evaluation of veterinary active ingredients and formulations. *Proceedings of the 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), pp. 444-449.

Mörtl M., Takács E., **Klátyik Sz.**, Székács A. (2017): Determination of surfactants used in agrochemicals. *18th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC)* (Porto, Portugal), pp. 26-29.

² a folyóirat elmúlt 2 éves impakt faktorának átlagával számolva

- Sági Gy., Bezsenyi A., Kovács K., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Székács A., Wojnárovits L., Takács E. (2017): Changes in the biological degradability and toxicity of sulfonamide antibiotics in activated sludge and river water due to ionizing radiation treatment. *Programme and Abstracts - International Conference on Applications of Radiation Science and Technology (ICARST-2017)* (Vienna, Austria), p. 165.
- Barócsi A., Lenk S., **Klátyik Sz.**, Takács E., Szarvas G., Gádoros P., Domján L., Kocsányi L., Székács A. (2018): Indication of algae density and polycyclic aromatic hydrocarbons in water quality assessment using sensitive fluorescent techniques at high dynamic range. 5. *5th Leaf Optics Workshop* (Ebernburg, Germany), pp. 5-6.
- Gémes B., **Klátyik Sz.**, Lázár D., Kocsányi L., Takács E., Székács A. (2018): Comparison of four methods to estimate algal biomass in pesticide toxicity assays. *Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering* (Budapest, Hungary), p. 62.
- Adányi N., Berki M., Kónya É., **Klátyik Sz.**, Lázár D., Gémes B., Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Csőke L. T., Csákányi A., Domján L., Szarvas G., Kocsányi L., Székács A. (2019): Fluorescence instrumentation for rapid, *in situ* water quality assessment. *11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2019)* (Athens, Greece), p. 151.
- Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Csőke L. T., **Klátyik Sz.**, Lázár D., Berki M., Adányi N., Csákányi A., Domján L., Szarvas G., Kocsányi L., Székács A. (2019): Sensitive fluorescence instrumentation for water quality assessment. *Conference Proceedings OSA Optical Sensors and Sensing Congress* (San Jose, CA, USA), p. 20.
- Lázár D., Gémes B., **Klátyik Sz.**, Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Kocsányi L., Adányi N., Takács E., Székács A. (2019): Fluorescence instrumentation for rapid, *in situ* water quality assessment. *11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2019)* (Athens, Greece), p. 211.

Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók:

- Füleki L., **Klátyik Sz.**, Gyurcsó G., Bánáti H., Kardos C., Szternácsik K., Takács E., Magor Cs., Székács A., Darvas B. (2014): A Magyarországon 1962-2013 között gyomok ellen alkalmazott hatóanyagok [No 3]. *Abs. IV. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 11-12.
- Klátyik Sz.**, Földi A., Ács É., Cséffán T., Pasaréti Gy., Mörtl M., Takács E., Bohus P., Székács A., Darvas B. (2015): Balatoni és dunai biofilmek (kék-, zöld-, kovaalga) reakciója

- Roundup készítményre és összetevőire (*glyphosate*, *POEA*). *Abs. V. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 17-19.
- Ottucsák M., Takács E., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Székács A. (2015): A környezet- és élelmiszer-biztonsági kockázatok súlyozása a *glyphosate* gyomirtó-hatóanyag és adjuvánsai példáján. *Abs. V. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 28-29.
- Klátyik Sz.**, Földi A., Trábert Zs., Pozderka V., Ács É., Cséffán T., Pasaréti Gy., Mörtl M., Takács E., Bohus P., Székács A., Darvas B. (2016): Roundup Classic gyomirtó szer és összetevőinek (*glyphosate*, *POEA*) hatása természetes biofilmek algaközösségeire. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 17-19.
- Klátyik Sz.**, Mörtl M., Takács E., Székács A., Darvas B. (2016): Neonikotinoid rovarirtószer-hatóanyagok és -készítmények hatása nagy vízibolhán (*Daphnia magna*). *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 19-20.
- Klátyik Sz.**, Székács A., Darvas B., Mörtl M. (2016): A *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag lebomlása balatoni és dunai vízmintákban, valamint biofilmek jelenlétében. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 21-22.
- Klátyik Sz.**, Földi A., Ács É., Takács E., Mörtl M., Székács A., Darvas, B. (2017): A *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag hatásai a vízi életközösségekre. *Abs. III. Parlamenti Nyílt Napok a GMO-król* (Budapest), pp. 65-66.
- Klátyik Sz.**, Földi A., Ács É., Takács E., Mörtl M., Székács A., Darvas B. (2017): A *glyphosate*-tartalmú gyomirtószer-hatóanyagok hatásai vízi életközösségekre. *Abs. VII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 23-24.
- Klátyik Sz.**, Sági Gy., Takács E., Kovács K., Wojnárovits L., Takács E., Darvas B., Székács A. (2017): Állatgyógyászatban alkalmazott készítmények és hatóanyagok összehasonlító vizsgálata. *Abs. VII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 25-26.
- Mörtl M., Takács E., **Klátyik Sz.**, Székács A. (2017): Növényvédő szerek tapadásfokozó adalékanyagainak meghatározása. *Program és előadás-összefoglalók – 60. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés és XIII. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia* (Debrecen), p. 138.
- Székács A., Mörtl M., Takács E., **Klátyik Sz.**, Gyurcsó G., Simon L., Oláh M., Darvas B. (2017): Növényvédő szerek és állatgyógyászati termékek adalékanyagainak meghatározása és ökotoxikológiai értékelése. *Program és előadás-összefoglalók – 60. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés és XIII. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia* (Debrecen), p. 74.

- Gémes B., **Klátyik Sz.**, Lázár D., Lenk S., Barócsi A., Kocsányi L., Takács E., Székács A. (2018): Toxicitási tesztekben alkalmazott algabiomassza-bebecslési módszerek összehasonlítása. *Abs. VIII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 10-11.
- Klátyik Sz.**, Mörtl M., Takács E., Székács A. (2018): A lineáris alkil-benzol-szulfonátok toxicitása és lebomlása felszíni vizekben önmagukban és neonikotinoidok jelenlétében. *Abs. VIII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 12-13.
- Lázár D., Gémes B., **Klátyik Sz.**, Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Kocsányi L., Adányi N., Takács E., Székács A. (2019): Algadenzitás *in situ* meghatározása fluoreszcenciás módszerrel. *Abs. IX. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 14-15.
- Lázár D., Gémes B., **Klátyik Sz.**, Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Kocsányi L., Adányi N., Takács E., Székács A. (2019): Algadenzitás *in situ* meghatározása fluoreszcenciás módszerrel. *LXI. Hidrobiológus Napok - Új utak a hidrobiológiában* (Tihany) p. 21.

Összesített hatástényező (impakt faktor): 24,529

Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk

Nemzetközi kiadó által kiadott idegen nyelvű könyvfejezet:

- Klátyik Sz.**, Molnár H., Pék M., Bata-Vidács I., Adányi N., Székács A. (2017): Quality management in spice paprika production: from cultivation to end product. In: *Quality Management Systems* (Kounis, L. Ed.), InTech. Rijeka, Croatia.

Idegen nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

- Klátyik Sz.**, Darvas B., Mörtl M., Ottucsák M., Takács E., Bánáti H., Simon L., Gyurcsó G., Székács A. (2016): Food safety aspects of pesticide residues in spice paprika. *Int. J. Nutr. Food Eng.* **10**: 156-159.
- Sági Gy., Bezsenyi A., Kovács K., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Székács A., Wojnarovits L., Takács E. (2017): The impact of H₂O₂ and the role of mineralization in biodegradation or ecotoxicity assessment of advanced oxidation processes. *Radiat. Phys. Chem.* **144**: 361-366. *IF: 1,984*
- Klátyik Sz.**, Darvas B., Oláh M., Mörtl M., Takács E., Székács A. (2017): Pesticide residues in spice paprika and their effects on environmental and food safety. *J. Food Nutr. Res.* **56**: 201-218. *IF: 0,687*

Mörötl M., **Klátyik Sz.**, Molnár H., Tömösközi-Farkas R., Adányi N., Székács A. (2018): The effect of intensive chemical plant protection on the quality of spice paprika. *J. Food Comp. Anal.* **67**: 141-148. IF: 2,994

Mörötl M., Takács E., **Klátyik Sz.**, Székács A. (2020): Appearance of thiacloprid in the guttation liquid of coated maize seeds. *Int. J. Environ. Public Health* **17**: 3290. IF: 2,468

Magyar nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

Klátyik Sz., Bata-Vidács I., Madar I., Pálfi T., Pasaréti Gy., Környei J., Székács A. (2016): Egyedi fűszerminták párhuzamos csírámentesítése ionizáló sugárzással. *Élelmiszer Tudomány Technológia* LXX **3**: 1-9.

Idegen nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók:

Ottucsák M., **Klátyik Sz.**, Gyurcsó G., Mörötl M., Darvas B., Székács A. (2015): Environmental monitoring of glyphosate and assessment of its combined cytotoxicity with adjuvants. *Proceedings of the 21st International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), pp. 64-67.

Klátyik Sz., Darvas B., Mörötl M., Simon L., Bánáti H., Gyurcsó G., Székács A. (2016): Pesticide residues in spice paprika in the RASFF system. *Abs. SPICED Symposium "Spices and Herbs - A Risk Free Taste Experience?"* (Berlin, Germany), p. 111.

Ottucsák M., **Klátyik Sz.**, Mörötl M., Székács A. (2016): Pesticide residues in environmental and produce samples from ecological and conventional paprika cultivation fields. *Proceedings of the 22nd International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), pp. 380-384.

Székács I., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Horváth R., Székács A. (2016): Cytotoxicological assessment of glyphosate, its herbicide product and the surfactant used for its formulation by holographic microscopy. *Abs. 9th european Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the environment és 15th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides* (Santiago de Compostela, Spain), pp. 393-394.

Berki M., Kónya É., Gémes B., **Klátyik Sz.**, Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Csőke L. T., Csákányi A., Domján L., Szarvas G., Kocsányi L., Adányi N., Székács A. (2019): Fluorescence instrumentation for rapid, *in situ* determination of PAHs in surface water. *11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2019)* (Athens, Greece), p. 212.

Kónya É., Berki M., **Klátyik Sz.**, Lázár D., Csősz D., Lenk S., Barócsi A., Csőke L. T., Csákányi A., Domján L., Szarvas G., Kocsányi L., Adányi N., Székács A. (2019): Fluorescence instrumentation for rapid, *in situ* determination of dissolved organic matter in water. *11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2019)* (Athens, Greece), p. 210.

Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók:

Fejes Á., Takács E., Juracsek J., **Klátyik Sz.**, Fekete G., Darvas B. (2012): Cry-toxin tartalmú kukoricák vízben való lebomlásának vizsgálata és toxikológiai értékelése. *Abs. II. Környezetanalitikai és Ökotoxikológiai Konferencia, Magyar Ökotoxikológiai Társaság* (Budapest), p. 11.

Bánáti H., Füleki L., **Klátyik Sz.**, Tóth Á., Kardos C., Takács E., Szternácsik K., Magor Cs., Székács A., Darvas B. (2014): A Magyarországon 1962-2014 között fitopatogén gombák ellen alkalmazott hatóanyagok [No 2]. *Abs. IV. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 5-6.

Darvas B., Füleki L., Bánáti H., **Klátyik Sz.**, Fejes Á., Székács A. (2014): A géntechnológiai úton módosított növények engedélyezése - az egyes országok stratégiái. *Abs. IV. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 8-10.

Darvas B., Pasaréti Gy., Cséffán T., Gyurcsó G., Vajdovich P., Szabó B., Baska F., Simon L., Bánáti H., Takács E., **Klátyik Sz.**, Fejes Á., Juracsek J., Magyarósy B., Ardó L., Székács A. (2015): Egy- és háromhónapos takarmányozási kísérlet *MON810* és *DAS-59122 GM*-táppal amuron (*Ctenopharyngodon idella*) – [No 1] Tömegmérés és vérkémia. *Abs. V. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 11-12.

Gyurcsó G., Simon L., Bánáti H., Juracsek J., **Klátyik Sz.**, Takács E., Pasaréti Gy., Székács A., Darvas B. (2016): Háromhónapos takarmányozási kísérlet *MON 810* és *DAS-59122 GM*-táppal amuron (*Ctenopharyngodon idella*) - [No 4] Enzimológiai vizsgálatok (amiláz, tripszin, leucin-aminopeptidáz) a közép- és utóbélben. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 14-15.

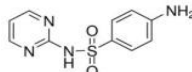
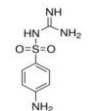
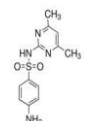
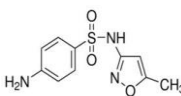
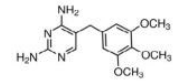
Klátyik Sz., Darvas B., Mörtl M., Simon L., Bánáti H., Gyurcsó G., Székács A. (2016): Fűszerpaprika-tételek növényvédőszer-maradékos szennyezettsége a *RASFF* adatbázisa alapján. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 16-17.

Klátyik Sz., Pasaréti Gy., Bata-Vidács I., Madar I., Pálfi T., Környei J., Székács A. (2016): Egyedi fűszerminták párhuzamos csíramentesítése ionizáló sugárzással. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 20-21.

- Székács I., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Horváth R., Székács A. (2016): A *glyphosate* formázott készítményének és formázó anyagának citotoxicitási vizsgálatai holografikus mikroszkópia segítségével. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 36-37.
- Takács E., Juracsek J., Bánáti H., **Klátyik Sz.**, Darvas B., Székács A. (2016): A Cry3-toxin (DAS-59122) sorsa az amur tápcsatornájában [No 3]. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 38-39.
- Takács E., **Klátyik Sz.**, Mörtl M., Weber M., Maderthaner M., Gruber E., Zaller J. G., Székács A. (2018): A *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag, mint expozíciós marker földigilisztatoxicitási vizsgálatokban. *Abs. VIII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Budapest), pp. 38-39.

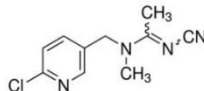
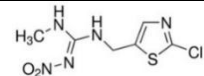
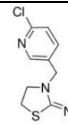
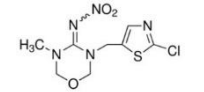
3. MELLÉKLET: A VIZSGÁLT HATÓANYAGOK ÉS KÉSZÍTMÉNYEK

I. táblázat A vizsgált állatgyógyászati hatóanyagok és készítmények összetétele és jellemzői

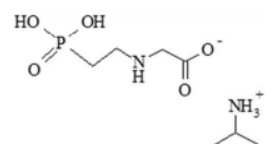
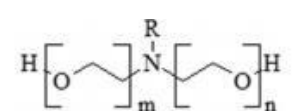
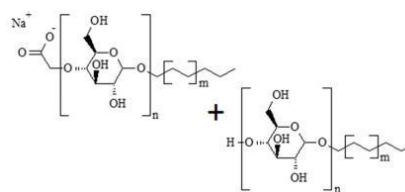
Aktív hatóanyagok					
Megnevezés	CAS szám	Az aktív hatóanyag koncentrációja	Fizikai megjelenés	Szerkezeti képlet	
sulfadiazine (SDZ) (4-amino-N-(pirimidin-2-il)-benzol-szulfonamid)	68-35-9	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
sulfaguanidine (SGD) (4-amino-N-[amino-(imino)-metil]-benzol-szulfonamid)	57-67-0	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
sulfamethazine (SMZ) (4-amino-N-(4,6-dimethyl-pirimidin-2-il)-benzol-szulfonamid)	57-68-1	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
sulfamethoxazole (SMX) (4-amino-N-(5-metil-izoxazol-3-il)-benzol-szulfonamid)	723-46-6	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
trimethoprim (TRI) (2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxi-benzil)-pirimidin)	138-70-5	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
Készítmények					
Megnevezés	Aktív hatóanyag(ok)	Az aktív hatóanyag koncentrációja	Adalékanyagok	Adalékanyagok koncentrációja	Kiszerelés
SUMETROLIM	SMX	400 mg SMX	sztearin, glicerin, nátrium-karboxi-metil-amilopektin, magnézium-sztearát, zselatin, talkum, burgonyakeményítő	n.a. ¹	tabletta
	TRI	80 mg TRI tablettánként			
COTRIM E-ratiopharm	SMX TRI	400 mg SMX 80 mg TRI 5 ml szuszpenzióban	szorbit-oldat (nem kristályosodó), szilikagél, nátrium-ciklamát, szacharin-nátrium, karamellóz-nátrium, 96%-os etanol, metil-hidroxi-benzoát, propil-hidroxi benzoát, dimetikon, metil-cellulóz, szorbinsav, banán aroma, vanisol aroma, tisztított víz	70% n.a.	fehér színű szuszpenzió (100 ml)

n.a.: nincs adat

II. táblázat A vizsgált neonikotinoid-típusú hatóanyagok és készítmények összetétele és jellemzői

Aktív hatóanyagok					
Megnevezés	CAS szám	Az aktív hatóanyag koncentrációja	Fizikai megjelenés	Szerkezeti képlet	
acetamiprid (ACE)	160430-64-8	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
clothianidin (CLO)	210880-92-5	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
thiacloprid (TCL)	111988-49-9	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
thiamethoxam (TMX)	153719-23-4	≥ 97,5%.	szilárd, fehér por		
Készítmények					
Megnevezés	Aktív hatóanyag(ok)	Az aktív hatóanyag koncentrációja	Adalékanyagok	Adalékanyagok koncentrációja	Formuláció típusa
ACTARA 240 SC	TMX	21,6%	etoxilált poliaril-fenol foszfát észter (CAS 90093-37-1) trisztiril-fenol etoxilátok, polietilén-glikol mono(trisztirilfenil)-éter, etoxilált poliarilfenol (CAS 56-81-5)	1–5% 1–5%	vizes szuszpenzió koncentrátum
APACHE 50 WG	CLO	50%	kalcinált diatóma föld (CAS 91053-39-3) C _{14–18} -alkánhidroxi-, C _{12–20} -alkapolién-, C _{14–18} -alkén-, és C ₁₂₋₂₀ -alkénhidroxi-szulfonsavak, Na-sók (CAS 68937-98-4)	≥ 10% ≥ 10%	vízben diszpergálható granulátum
CALYPSO 480 SC	TCL	40,4%	benzizotiazolinon (CAS 2634-33-5)	0,01–0,05%	vizes szuszpenzió koncentrátum
MOSPILAN 20 SG	ACE	20,0%	benzolszulfonsav, mono C _{10–13} -alkil származékok, Na-sók (LAS (C _{10–13})) (CAS 15015-81-3)	2,4%	vízoldható granulátum

III. táblázat A vizsgált *glyphosate*-tartalmú növényvédőszer- és formázószer-készítmények összetétele és jellemzői

Aktív hatóanyagok					
Megnevezés	CAS szám	Az aktív hatóanyag koncentrációja	Fizikai megjelenés	Szerkezeti képlet	
glyphosate-izopropilammónium-só (GLY-IPA-só)	38641-94-0	62% (486 g/l GLY szabad sav)	vízoldható emulzió		
Növényvédőszer-készítmények					
Megnevezés	Aktív hatóanyag(ok)	Az aktív hatóanyag koncentrációja	Adalékanyagok	Adalékanyagok koncentrációja	Formuláció típusa
ROUNDUP CLASSIC	GLY-IPA-só	41,5% (360 g/l GLY szabad sav)	polietoxilált faggyúaminok keveréke (POEA)	15,5%	folyékony vízoldható koncentrátum
MEDALLON PREMIUM	GLY-diammónium-só (CAS 69254-40-6)	34% (360 g/l GLY szabad sav)	alkil-poliglükozid (APG)	10–20%	folyékony vízoldható koncentrátum
Formázóanyag készítmények					
Megnevezés	Formázóanyag	A formázóanyag koncentrációja	A formázóanyag szerkezeti képlete	Adalékanyagok	Formuláció típusa
EMULSON AG GPE 3SS	POEA (CAS 61791-26-2)	100%		–	vízoldható emulzió
PLANTAPON LGC	APG (Na-lauril-glükóz-karboxilát CAS 383178-66-3 + lauril-glükozid CAS 110615-47-9)	28,5–34,0%		n.a. ¹	vízoldható emulzió

n.a.: nincs adat

4. MELLÉKLET: A BIOFILMVIZSGÁLATOK JELLEMZŐI

	1. kísérlet (2015)	2. kísérlet (2016)
A vizsgálat célja:	(1) A <i>glyphosate</i> hatásainak vizsgálata természetes körülmények között kialakult biofilmek szerkezetére, algaközösségeinek biomasszájára és kovaalga-közösségének összetételére tiszta hatóanyag és formázott készítmény formájában (2) A <i>glyphosate</i> lebomlásának vizsgálata tiszta hatóanyag és formázott készítmény formájában balatoni és dunai vízmintákban, biofilmek jelenlétében és anélkül	(1) A ROUNDUP CLASSIC és összetevőinek hatása a természetes körülmények között kialakult biofilmek algaközösségeinek biomasszájára.
Kolonizáció időtartama:	6 hét (2015.05.06.–2015.06.17.)	6 hét (2016.05.02. –2016.06.16.)
Kolonizáció helyszíne:	(1) Duna, „Zöld-sziget” úszómű Budapest (47.481641, 19.057645) (2) Balaton, ELKH BLK kikötője, Tihany (46.914190, 17.892916)	(1) Duna, „Zöld-sziget” úszómű Budapest (47.481641, 19.057645) (2) Velencei-tó, Német-tisztás, Pákozd (47.199571, 18.560648)
A kísérlet kezdetének időpontja:	2015. június 17.	2016. június 16.
Expozíció időtartama:	10 hét	6 hét
Mintavételi napok:	(1) biológiai mintavétel: kísérlet elején, majd kéthetente (2) analitikai mintavétel: 1. héten naponta, majd hetente az első 7 héten keresztül	(1) biológiai mintavétel: kísérlet elején, majd kéthetente
Kezelések¹:	- 1DK, 2DG, 3DR - 5BK, 6BG, 7BR - 9LDG, 10LDR, 11LBG, 12LBR	- 1DK, 2DG, 3DR, 4DP - 5VK, 6VG, 7VR, 8VP

¹A kezelések esetében használt kódokban a számok jelölik az akvárium sorszámát, míg a betűk a biofilmnövesztés helyét (D: Duna, B: Balaton, V: Velencei-tó) és a kezeléseket jelölik (K: kontroll, G: *glyphosate*, R: ROUNDUP CLASSIC, P: POEA), továbbá a L betű jelöli a lebomlási vizsgálatokban beállított akváriumokat

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Székács Andrásnak a munkám során nyújtott szakmai irányítást, a rengeteg tanítást és feltétlen támogatást, amelyek nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönettel tartozom Dr. Nagy Péternek, aki társtémavezetőként hasznos szakmai tanácsaival járult hozzá doktori értekezésem elkészítéséhez.

Kiemelt köszönetem illeti Prof. Darvas Bélát és Dr. Takács Esztert, akik kutatói munkám során szintén mindvégig támogattak szakmailag és emberileg egyaránt.

Köszönettel tartozom a NAIK-AKK Ökotoxikológiai Osztály munkatársainak, kiemelve Pásáréti Gyulát, Cséffán Tamást, Magyarósy Balázst, Takács Dánielt és Olajos Juditot, akik nagy segítségemre voltak a biofilmes vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen algabója kialakításában, a kísérleti rendszer kialakításában, továbbá a kísérletek gyakorlati lebonyolításában. A munkám nem lehetne teljes a NAIK-AKK Környezetanalitikai Osztályán végzett lebomlási vizsgálatok nélkül, így szeretném megköszönni Dr. Mörtl Máriának, Juracsekné Nádasdi Juditnak és Magor Csillának az analitikai vizsgálatok során nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti Dr. Bohus Pétert, aki biztosította számunkra a *glyphosate* hatóanyag formázása során alkalmazott polietoxilált faggyúaminok keverékét (*POEA*) a kísérletek során.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Győri Jánosnak (ELKH BLK), aki nagy segítségemre volt az enzimaktivitás-vizsgálatok elsajátításában és végrehajtásában. Köszönettel tartozom Prof. Ács Évának, Földi Angélának és Trábert Zsuzsának (ELKH ÖK VÖI), hogy segítségemre voltak a biofilmes vizsgálatok műszeres és elektronmikroszkópos kiértékelésében.

Köszönet illeti Dr. Szabó Borbálát és Hanny-Endrédi Anettet az adatok statisztikai elemzésében nyújtott segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban ezúton is szeretnék köszönetet mondani a Családomnak, a Páromnak, valamint a Barátaimnak a végtelen türelmükért és támogatásukért.

Vizsgálataim az alábbi kutatási pályázatokhoz kapcsolódtak: OTKA K109865 - „Állatgyógyászati és mezőgazdasági felületaktív anyagok mechanizmusfüggő teratogén, hormonmoduláns és egyéb toxikus hatásai”, OTKA K102978 - „Neurotoxikus hatású biológiailag aktív vegyületek és metabolitjaik azonosítása, és hatásuk kémiai/ökotoxikológiai jellemzése”, NVKP_16-1-2016-0049- „Komplex vízminősítést *in situ* megvalósító, közvetlen és immunfluoreszcencián, valamint optikai és lézeres plazma-színképelemzésen alapuló, moduláris, érzékelő- és műszercsalád kifejlesztése, továbbá az alkalmazási területek kutatása”.