



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**GYAKORI KÖRNYEZETI MEGJELENÉSŰ HERBICIDEK
ÖKOTOXIKOLÓGIAI ÉS BIODEGRADÁCIÓS SZEMPONTÚ
VIZSGÁLATA**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DOI: 10.54598/002290

TÓTH GERGŐ

Gödöllő

2022

A doktori iskola

megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika, DSc
egyetemi tanár, intézetigazgató
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Környezettudományi Intézet

Témavezető(k): Dr. Szoboszlai Sándor, PhD
egyetemi docens
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Környezetbiztonsági Tanszék

Dr. Háhn Judit, PhD
tudományos munkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Környezetbiztonsági Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
3.1 Általánosságban a herbicidekről	12
3.2 Glyphosate bemutatása	13
3.2.1 <i>A glyphosate jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paraméterei.....</i>	<i>13</i>
3.2.2 <i>Glyphosate-alapú készítmények.....</i>	<i>15</i>
3.2.3 <i>Glyphosate és glyphosate-alapú készítmények toxicitása, káros biológiai hatásai.....</i>	<i>17</i>
3.2.4 <i>Glyphosate és az AMPA környezeti előfordulása, sorsa és degradációja.....</i>	<i>21</i>
3.3 Mesotrione bemutatása	25
3.3.1 <i>A mesotrione jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paraméterei</i>	<i>25</i>
3.3.2 <i>Mesotrione toxicitása, káros biológiai hatásai.....</i>	<i>26</i>
3.3.3 <i>Mesotrione környezeti előfordulása, sorsa és degradációja</i>	<i>28</i>
3.4 S-Metolachlor bemutatása	30
3.4.1 <i>Metolachlor*/S-metolachlor jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai</i>	<i>paramét</i>
<i>erei</i>	<i>30</i>
3.4.2 <i>Metolachlor*/S-metolachlor toxicitása, káros biológiai hatásai</i>	<i>32</i>
3.4.3 <i>Metolachlor*/S-metolachlor környezeti előfordulása, sorsa, degradációja</i>	<i>35</i>
3.5 Terbutylazine bemutatása	36
3.5.1 <i>Terbutylazine hatóanyag jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paraméterei</i>	<i>.....</i>
.....	<i>36</i>
3.5.2 <i>Terbutylazine toxicitása, káros biológiai hatásai.....</i>	<i>37</i>
3.5.3 <i>Terbutylazine környezeti előfordulása, sorsa, degradációja.....</i>	<i>39</i>
3.6 Bioripporter tesztrendszerek az ökotoxikológiában	42
3.7 A herbicid keverékek együttes, biológiai/ökotoxikológiai hatásai.....	44
3.8 Szennyezett területekről izolált mikroorganizmusok biodegradációs és	
adaptációs potenciálja.....	46
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	48
4.1 A növényvédő szerek és keverékeik, illetve a biodegradációs	
maradékanyagok biológiai hatáselemzésére alkalmazott ökotoxikológiai tesztek	
.....	48
4.1.1 <i>A vizsgált vegyületek és az azokból készített törzsoldatok.....</i>	<i>48</i>

4.1.2 Akut <i>Aliivibrio fischeri</i> Microtox® citotoxicitási teszt	51
4.1.3 Krónikus <i>Aliivibrio fischeri</i> citotoxicitási teszt.....	53
4.1.4 Direkt hormonhatás mérése <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alapú BLYES/BLYAS bioriporterekkel.....	55
4.1.5 Az ökotoxikológiai tesztek statisztikai elemzése, értékelése.....	56
4.1.6 Kombinációs Index Módszer (KIM).....	57
4.2 A növényvédőszer hatóanyagok biodegradációjára és biodetoxifikációjára irányuló vizsgálatok	58
4.2.1 A mintavételi helyszínek és mintavételezés	58
4.2.1.1 Közép-magyarországi szénhidrogénnel szennyezett kárhely.....	59
4.2.1.2 Cegléd – intenzív gazdálkodású mezőgazdasági terület.....	60
4.2.1.3 Balaton részvízgyűjtő területén található befolyó és elfolyó vízfolyások.....	61
4.2.2 Mikrobák izolálása környezeti elemekből	63
4.2.3 Az izolált baktériumtörzsek faj szintű identifikációja 16S rDNS alapon	64
4.2.4 Biodegradációs kísérletek	66
4.2.4.1 Aerob/oxigénnel ellátott körülmények között végzett biodegradációs kísérletek	66
4.2.4.2 Mikroaerob/oxigénlimitált körülmények között végzett biodegradációs kísérletek...	67
4.2.5 Akkreditált kémiai-analitikai vizsgálatok.....	69
5. EREDMÉNYEK.....	70
5.1 Herbicid hatóanyagok, keverékek és készítmények biológiai hatásmérésén alapuló ökotoxikológiai tesztek	70
5.1.1 Akut és krónikus <i>Aliivibrio fischeri</i> citotoxicitási tesztek (<i>mesotrione</i> , <i>S-metolachlor</i> , <i>terbuthylazine</i>)	70
5.1.2 Herbicid hatóanyag keverékek szinergista, additív, antagonistá hatásaik megállapítása a KIM-mel	74
5.1.2.1 Akut AVF teszt.....	74
5.1.2.2 Krónikus AVF teszt	75
5.1.3 Akut és krónikus <i>Aliivibrio fischeri</i> citotoxicitási tesztek [<i>glyphosate</i> , <i>AMPA</i> , <i>POE(15)</i> , <i>glyphosate-tartalmú készítmények (13)</i>]	78
5.1.4 Hormonális aktivitás és sejtoxikus hatások vizsgálata <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alapú bioriporterekkel (<i>BLYAS</i> , <i>BLYES</i> , <i>BLYR</i>).....	83
5.1.5 A <i>glyphosate</i> -alapú készítmények citotoxicitása és hormonális aktivitása a hígítás százalékában kifejezve a mezőgazdasági és kiskerti felhasználásra ajánlott értékekhez képest	90
5.2 Potenciálisan peszticid-bontó baktériumnemzetségek keresése és jellemzése	92

5.3 A herbicid hatóanyagok biodegradációja és biodetoxifikációja	99
5.3.1 A baktériumtörzsek biodegradációs és biodetoxifikációs képessége aerob körülmények között.....	99
5.3.2 A baktériumtörzsek biodegradációs és biodetoxifikációs képessége mikroaerob körülmények között.....	102
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	104
7. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	106
8. ÖSSZEFOGLALÁS	113
9. ENGLISH SUMMARY	115
10. MELLÉKLETEK	117
M1. Irodalomjegyzék	117
M2. Doktori kutatómunkám során különböző célzattal megfogalmazott feladatok és azok végrehajtásához szükséges vizsgálatok folyamatábrája.	151
M3. Az <i>Aliivibrio fischeri</i> tápoldatának (Bacto Marine Broth – BMB, DIFCO 2216) összetétele.	152
M4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (BLYES, BLYAS, BLYR) YMM (Yeast Mineral Medium) tápoldatának összetétele.	152
M5. A ceglédi mintavételi terület (VIII. tábla) permetezési naplója 2005-től 2016-ig.	153
M6. A ceglédi mintavételi terület (VIII. tábla) közelében, a központi területi táblákon kijuttatott, szempontomból releváns gyomirtó szer készítmények. ...	155
M7. A Mineral Medium ásványisó tápoldat (OIR-III) tápoldat összetétele.	155
M8. A Luria-Bertani (LB) táptalaj összetétele.	155
M9. A TGE-5 táptalaj összetétele.	155
M10. FAHY tápoldat összetétele.	156
M11. A vizsgált <i>glyphosate</i>-alapú herbicid készítmények vízi élőlényekre megállapított ökotoxicitása a biztonságtechnikai adatlapjuk alapján (MSDS).	156
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	157

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADI	A cceptable D aily I ntake - megengedhető napi beviteli mennyiség [mg/testtömeg kilogramm/nap] értékben.
AM-só	A mmónium-só
AOEL	A cceptable O perator E xposure L evel - felhasználókat érintő elfogadható expozíciós szint
ARfD	A cute R eference D ose – Akut Referencia Dózis
ATP	A denosine t riphosphate – Adenozin-trifoszfát
AVF	<i>Aliivibrio fischeri</i>
BLYAS	B ioluminescent yeast a ndrogen screen
BLYES	B ioluminescent yeast e strogen screen
BLYR	B ioluminescent yeast r eporter
CFU	C olony F orming U nit – Telepképző egység
CPS	C ounts P er S econd – Másodpercenkénti fotonbecsapódások száma
DHT	5- α - d ihidrotesztoszteron
DMSO	D imethyl sulphoxide – Dimetil-szulfoxid
DIAM-só	D iammónium-só
DMA-só	D imetilamin-só
DT ₅₀	D egradation t ime of 50% – Féléletidő, mely alatt egy adott vegyület kiindulási mennyiségének az 50%-a lebomlik
E2	17- β - e tinilösztradiol
EC ₅₀	50% E ffective C oncentration – 50%-os hatást kiváltó, effektív koncentráció érték
ED	E ndokrin D iszruptor
EDC	E ndocrine D isrupting C hemical – Endokrin Diszruptor Vegyület
EFSA	E uropean F ood S afety A uthority – Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
EPSPS	5-Enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate-Synthase – 5-enol-piruvil-sikimát-3 foszfát-szintáz
EU	E urópai U nió
IARC	I nternational A gency for R esearch on C ancer – Nemzetközi Rákkutató Ügynökség
IPA-só	I zopropilamin-só (<i>glyphosate</i>)
KIM	K ombinációs I ndex M ódszer
K-só	K álium só- <i>(glyphosate)</i>

LC ₅₀	50% Lethal Concentration – Tesztszervezetek 50%-ának pusztulását okozó letális koncentráció érték
LD ₅₀	50% Lethal Dose – Tesztszervezetek 50%-ának pusztulását okozó letális dózis érték
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration – Legalacsonyabb, megfigyelhető hatást kiváltó koncentráció
MOA	Mode Of Action – Hatásmechanizmus
NAIK	Nemzeti Agrárkutató és Innovációs Központ
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc- biztonsági Hivatal
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level – A legnagyobb koncentráció/dózis, amely még nem okoz megfigyelhető káros hatást.
POEA	Polyethoxylated tallowamine – Polietoxilált faggyúamin
US EPA	United States Environmental Protection Agency – Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala
WHO	World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet
YMM	Yeast Minimal Medium – Élesztő minimál tápoldat

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Haszonnövényeink és állataink védelme, a termésmennyiségek növelésének, a termékek minőségének javításának érdekében az emberiség jelenleg globálisan 3 millió tonna peszticidet használ fel évente. Felhasználásuk a XX. század közepe óta fokozatosan nő. Magyarországon 2020-ban a jelenleg legutolsó szerforgalmi jelentés alapján 28,9 ezer tonna növényvédő szer került forgalomba, melyek 40,6%-a gyomirtó, 28,3%-a gombaölő, 14,4%-a talajfertőtlenítő, 9,5%-a rovarölő szer volt. Az intenzív felhasználás következményeként azonban az élelmiszer-alapanyagokon és késztermékeken kívül az Északi-sarkvidéktől az Antarktiszig gyakorlatilag minden környezeti elemből kimutathatóak szermaradványok formájában, melyeknek a humán- és környezetegészségügyi hosszú távú hatásai gyakran ismeretlenek. Másodlagos hatásaik révén (perzisztencia, a nem célszervezetekre gyakorolt akut- és krónikus toxicitás) kockázatot jelentenek a velük exponálódó élő szervezetekre. Továbbá hozzájárulnak a környezet károsításának és a környezet szennyezésének folyamatához.

A növényvédő szerek engedélyezése ugyan rendkívül bonyolult és alapos folyamat, mely során egy hatóanyagnak számtalan kritériumnak kell megfelelnie, azonban a különböző kutatási módszerek fejlődésével párhuzamosan mégis több, korábban relatíve ártalmatlannak ítélt vegyület esetében derül fény arra, hogy a nem célszervezetekre gyakorol káros biológiai hatásokat. Ez különösen jelentős hosszú távú toxicitás (krónikus) esetében, amikor a növényvédőszer-maradványok gyakran csak kis koncentrációban, ám huzamos ideig vannak jelen a környezetben, ahol azok így hosszú távú kitettséget jelentenek az ökoszisztémára. Továbbá, hosszabb távon a peszticidek, illetve más szennyező anyagok, vegyületek között létrejövő interakciók következtében antagonista, szinergista, vagy additív folyamatok is felléphetnek. Ugyanakkor, e kölcsönhatásokról származó ismereteink még rendkívül hiányosak. Káros biológiai/toxikológiai/ökotoxikológiai hatásaik feltérképezésére már a '90-es évek óta fejlett módszerek állnak rendelkezésre, amelyek nem csak az akut, de krónikus toxikus hatások kimutatására is alkalmasak lehetnek, abban az esetben is, ha a xenobiotikumok viszonylag alacsony koncentrációban (ng/L- μ g/L) vannak jelen a környezeti elemekben.

Az új tudományos eredmények alapján betiltott és így a piacról lekerülő növényvédő szerek (pl. *atrazine**, *metolachlor**)¹ helyettesítésére nagyon gyorsan új jelentkezők lépnek, amelyek a leváltott molekulához hasonló szerkezettel és tulajdonságokkal rendelkeznek. Így például a triazin típusú herbicidek közül az *atrazine** leváltására a kémiai szerkezetében egy alkil-csoportban különböző *terbuthylazine*, míg a klóracetamidok csoportjából a racém-*metolachlor**

¹ * - Betiltott, nem engedélyezett hatóanyag az Európai Unióban és Magyarországon.

leváltásával a nagyobb herbicid aktivitású *S-metolachlor* felé vette a peszticid-ágazat az új irányt. A széles spektrumú herbicid hatás kiváltásának fokozása érdekében ezeket a molekulákat több, különböző biológiai hatásmechanizmussal rendelkező herbicid csoport képviselőivel „potenciózzák”. Tipikus példája ennek a *terbuthylazine* és az *S-metolachlor* együttes alkalmazása mellé bevont, *mesotrione* hatóanyag, mely egy természetes fitohormon szintetikus úton előállított analógja. Az új molekulák térhódítása, amit a felhasználható anyagok számbeli csökkenése okozott (kivonás/betiltás miatt), meghatározó szerepet vállalt a növényvédő szer forgalom élénkülésében, miközben ezen vegyületek környezetanalitikai és környezettoxicológiai szempontú megítélése jelenleg is a tudományos célkereszt közepén áll. Elődjeik növényvédő szer forgalomból történő kivonását a valószínűsíthető környezet- és humánegészségügyi kockázataik, valamint perzisztanciájuk (talaj- és vízszennyező anyagok), továbbá a környezeti elemeket érő, tartósan elhúzódó (nagy mennyiségben, fokozott felhasználású szerek) szennyező képességük indokolta.

Mellettük a *glyphosate*-ra, mint a világon legnagyobb mennyiségben alkalmazott és forgalmazott herbicid hatóanyagra is óriási figyelem irányult/irányul. Forgalomból történő kivonása mellett korteskedő lobbizás hangjai az elmúlt két évtizedben egyre erősebbek. Hírnevét és elterjedését a Roundup® márkánévvel illetett, a Monsanto vállalat által fejlesztett készítményekkel vívta ki, manapság pedig több, mint 750 készítményben megtalálható hatóanyagként. A *glyphosate* nem-célzott biológiai hatása rendkívül szerteágazó, számos tanulmány igazolta már, hogy több esetben nem maga a hatóanyag a legártalmasabb összetevő a *glyphosate* tartalmú szerekben. A hatóanyag mellett a készítményekben a formázására használt anyagok potenciális toxikus hatásait közlő tanulmányok folyamatosan látnak napvilágot. Ezek a formázóanyagok (legismertebb képviselő a POEA-család), melyek kémiaiilag kompatibilis vegyületek a hatóanyaggal, a célzott biológiai hatás tekintetében inerteek, viszont több esetben nem deklarált komponensek. A *glyphosate*-ot formázva velük azonban a nem-célzott szervezeteken kiváltott hatásai szempontjából nem inaktívak. A probléma tovább gyűrűzik azzal, hogy amíg a növényvédő szer gyártó cégek az engedélyezési vizsgálatok során tisztán csak a hatóanyaggal dolgoznak, addig a gyakorlat már készítményekkel (hatóanyag + formázó-, segéd- és felületaktív anyagok). A független tudományos kutatások is általában hatóanyagokat vizsgálnak, készítményeket nem minden esetben. Az egymásnak ellentmondó eredmények megszületésével a *glyphosate* toxikológiai megítélése rendkívül aggályos és állandó vita tárgyát képezi a hivatalos környezetvédelmi-, egészségügyi szervezetek és a független, tudományos világ között. Számos területen születtek/születnek olyan közlemények, amelyekben ellentmondásokkal teli eredmények olvashatók, példaként a hatóanyag nem, de az azt tartalmazó készítmény hormon-, immunmoduláns hatásokkal, vagy karcinogén, teratogén tulajdonságokkal

rendelkezik már. Feltételezések szerint a probléma oka a formázó-, segéd- és felületaktív anyagok körül keresendő.

A növényvédő szerek jellemzően mezőgazdasági, kertészeti/kiskerti alkalmazásuk során jutnak a környezetünkbe. A szennyvizek szántóföldi szikkasztása, a túllöntözés, a klímaváltozás okozta szélsőséges, extrém nagy csapadékmennyiségek (hirtelen, gyorsan lezúduló) felszíni lemosódás útján elősegítik a mezőgazdasági területeken használt vegyi anyagok mélyebb talajrétegekbe, felszín alatti víztestekbe való egyre nagyobb mértékű bemosódását, jelentős hányaduk a természetes élővizeket is terheli. Ez probléma lehet, hiszen azok a növényvédőszerhatóanyagok, amelyek a felső, szántott talajrétegben még viszonylag rövid idő alatt lebomlanak, azok a mélyebb rétegek felé húzódva, a felszín alatti vizekben, üledékekben - UV fény és oxigén hiányában – egy ún. másodlagos perzisztencia kialakulása során akár évtizedekig is változatlanul, káros/toxikus kémiai és biológiai aktivitásukat megtartva halmozódnak fel. További probléma lehet, hogy a kedvezőtlen körülmények között zajló lebomlásuk során sok esetben az anyavegyületnél lényegesen toxikusabb bomlástermékek, maradékanyagok keletkezhetnek. Költséghatékonysági szempontokat is figyelembe véve ezen vegyületek eliminálására a biodegradációs vizsgálatokon keresztül a bioremediációs technikák a megfelelőek. A kiindulási anyagokból képződött metabolitok hatásvizsgálati oldalról történő nyomon követésére (biodetoxifikáció) pedig a biológiai alapokon nyugvó ökotoxikológiai tesztek szolgálnak a legjobb megoldással.

Az említett peszticid hatóanyagok és keverékeik, valamint egyes készítmények ökotoxicitásának, bidegradálhatóságának és biodetoxifikálhatóságának megállapítása céljából a doktori munkám során a következő célokat határoztam meg:

- I. Herbicid készítményekben eltérő kombinációkban fellelhető, az Európai Unióban a legnagyobb mennyiségben alkalmazott anyagok közé tartozó:
 - *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine* hatóanyagok és azok különböző arányú keverékeik,
 - a *glyphosate* hatóanyag és legfőbb bomlásterméke, az AMPA, valamint *glyphosate*-alapú készítmények,
 - POE(15) formázószerakut és krónikus expozíció során kiváltott sejttoxikus hatásának megállapítása akut és krónikus citotoxikus hatás mérésére alkalmas *Aliivibrio fischeri* ökotoxikológiai teszttel.

- II. A *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine* hatóanyagok és különböző arányú keverékeik, valamint a *glyphosate*, az AMPA, a POE(15) formázószer, valamint *glyphosate*-alapú [bizonyítottan hormonrendszert károsító hatású POE(15) segédanyagot tartalmazó és nem tartalmazó] készítmények potenciális direkt hormonhatásának feltárása *Saccharomyces cerevisiae* alapú bioriporterekkel.
- III. Kombinált hatóanyag keverékek esetén a Kombinációs Index Módszerrel az alkalmazott tesztstruktúrára gyakorolt szinergista, additív és antagonistikus hatások megállapítása.
- IV. A *glyphosate*-ot, *mesotrione*-t, *S-metolachlor*-t és a *terbuthylazine*-t potenciálisan bontó baktériumtörzsek izolálása szennyezett környezeti elemekből, azok identifikálása, illetve a Környezetbiztonsági Tanszéken (KBT) meglévő törzsgyűjtemény folyamatos bővítése.
- V. A szennyezett környezeti elemekből izolált és identifikált baktériumtörzsek, valamint a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó, a tudományos szakirodalom alapján növényvédő szer hatóanyag degradáló tulajdonsággal rendelkező típus-törzsek *glyphosate*-, *mesotrione*-, *S-metolachlor*- és *terbuthylazine*-lebontó és -detoxifikáló képességének vizsgálata aerob és oxigénlimitált környezetben *in vitro*.
- VI. A *glyphosate*, a *mesotrione*, az *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* hatóanyagok biodegradációs dinamikájának összehasonlítása oxigénnel jól ellátott és oxigénlimitált körülmények között.
- VII. A jó bontási potenciállal rendelkező baktériumtörzsek által a herbicid hatóanyagokból aerált és oxigénlimitált körülmények között keletkező bontási maradékanyagok káros biológiai/ökotoxikológiai hatásainak vizsgálata.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Általánosságban a herbicidekről

A herbicidek néven is ismert gyomirtó szerek nemkívánatos gyomnövények elleni védekezésre használt anyagok. A herbicidek szelektivitásuk szempontjából két csoportba sorolhatóak. A szelektív herbicidek, meggátolva a meghatározott gyomfajok növekedését, a kultúrnövényt sértetlenül hagyják, míg a nem-szelektív herbicidek, amelyeket kereskedelmi készítményekként totális gyomirtóknak neveznek. A nem-szelektív herbicidek felhasználhatók a szennyvíztisztítási, az ipari és építkezési területek, a vasutak és a vasúti töltések gyommentesítésére, mivel minden növényt, amellyel érintkezésbe kerülnek, totális hatásukat kifejtve pusztítanak el. A herbicideket szelektivitásuk mellett több tényező is megkülönbözteti, úgymint a hatásuk perzisztenciája (mennyi ideig marad a szer a helyén és meddig marad aktív), a felvételük módja (pl. lombozaton, gyökereken keresztül) és a hatásmechanizmusuk. Felszívódásuk jellege szerint megkülönböztetjük a közvetlen növényfelületen ható (kontakt hatású) és a célnövény keringésébe bekerülő, felszívódó herbicid hatóanyagok csoportját. A szisztémikus hatásúak között azokat a szereket, melyek a felszívódás helyén maradnak (nem jutnak be a keringésbe), mélyhatású, vagy lokoszisztémikus szerekeknek nevezzük, míg a felszívódás helyéről transzlokálódó anyagok közül akropetális (gyökértől a csúcs felé xilémnedvvel vándorolnak) és bazipetális (csúcstól a gyökér felé szállítódnak) transzporttal rendelkezőket különítenek el. A herbicidek lehetséges hatásait erősen befolyásolja toxicitási hatásmódjuk és alkalmazási módjuk is (DUKE 1990, GUPTA 2017).

Magyarországon a forgalmazott növényvédő szerek felhasználása 2000-től napjainkra több mint a duplájára emelkedett, 2016-ban a forgalomba hozott hatóanyagok (27,5 ezer tonna) 47%-át a gyomirtó szerek, 9%-át rovarölő szerek, 39%-át gombaölő szerek, 5%-át egyéb szerek tették ki (KSH 2017). A legnagyobb mennyiségben értékesített és felhasznált készítmények tehát a herbicid típusú növényvédő szerek (AKI 2016). Habár a 2017-es tárgyévét követő folyamatos emelkedést (29,7 ezer tonna) a növényvédő szer értékesítésben és felhasználásban csökkenő tendencia követte. 2018-ban mintegy 26,6 ezer tonna, 2019-ben 25,4 ezer tonna peszticidet értékesítettek Magyarországon, amely egyes hatóanyagok kivonásának köszönhető (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal [NÉBIH] 2020). Az összes felhasznált mennyiségből szercsoportonkénti megoszlás alapján közel kétszerese volt a herbicid készítmények mennyisége a fungicid és az inszekticid csoporthoz képest (NÉBIH 2020). A NÉBIH által közölt 2020. évi szerforgalmi jelentés szerint a hatóanyag mennyiségeket rangsoroló lista első öt helyén három gyomirtó szer hatóanyag foglal helyet. Ezek közül 1. helyen áll a *glyphosate* a maga több, mint

1,792 millió kg mennyiségével, 3. és 5. helyen az *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* jelenik meg ~ 491 ezer kg és ~332 ezer kg-mal.

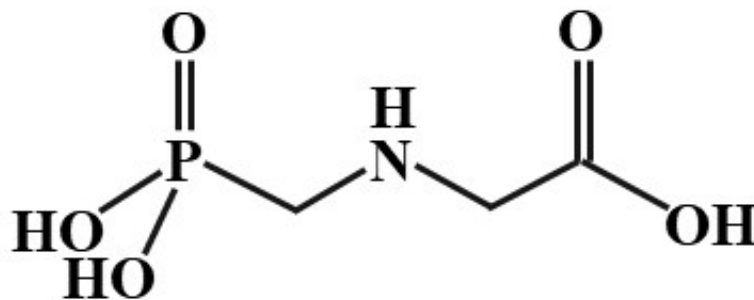
A herbicid készítmények közül a 2018-as és 2019-es években a III. szerforgalmi kategóriájú (szabadforgalmú) Fozát 480[®] (360 g/L *glyphosate*-sav, 480 g/L *glyphosate* IPA-só) vezette a legnagyobb mennyiségben felhasznált készítmények listáját. A Lumax[®] (II. forgalmi kategória [engedélyköteles], 37,5 g/L *mesotrione* + 375 g/L *S-metolachlor* + 125 g/L *terbuthylazine*) és a Gardoprim Plus Gold[®] (II. forgalmi kategória [engedélyköteles], 312 g/L *S-metolachlor* + 187 g/L *terbuthylazine*) váltva egymást (2018-ban és 2019-ben) a képzeletbeli dobogó 2. és a 3. fokán volt az eladási lista élmezőnyében (Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ [NAIK] 2020).

Doktori munkám során a fentebb leírt készítményekben megtalálható hatóanyagokat vizsgáltam (a listán a 24. helyen áll a *mesotrione* [~44 ezer kg]) (NÉBIH 2020).

3.2 *Glyphosate* bemutatása

3.2.1 *A glyphosate* jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paraméterei

A *glyphosate* [N-(phosphonomethyl) glycine, C₃H₈NO₅P] egy széles spektrumú, nem szelektív, totális-szisztémikus hatású, bazipetalisan transzlokálódó herbicid. A *glyphosate* molekula egy glicin-származék, amelyet először 1950-ben szintetizáltak, majd először a Monsanto vegyésze, Dr. John Franz 1970-ben azonosította gyomirtó tulajdonságú, szerves foszfor tartalmú, foszfonsav típusú vegyületként. A *glyphosate* erősen poláros, amfoter tulajdonságokkal és ikerionos kémiai szerkezettel rendelkező vegyület (**1. ábra**). Ezt követően formázták és szabadalmaztatták Roundup[®] márkánév alatti peszticid készítményként. A Roundup[®]-ot először az Egyesült Királyságban búzaföldeken és Malajziában kaucsukültetvényeken használták fel 1974-ben. Az Egyesült Államok 1974-ben engedélyezte a szert nem kultúrnövényeket érintő használatra. Ezt követően engedélyezték a használatát tarlók gyomkezelésére minden elérhető kultúrában, későbbiekben kiterjesztették használatát olajos magvak és gabonafélék betakarítását megelőző időszakokra is. Általában vetés előtti és utáni gyomnövénymentesítésre alkalmazzák szántóföldi növényeknél, elsősorban búza, kukorica és zab mellett. Ezen túlmenően más növények széles skálájának állományszárítását (desszikálás) végzik vele (szójabab, gyapot, dohány, napraforgó és genetikailag módosított [GM] növények) (BENBROOK 2016, STALIKAS & KONIDARI 2001, WHO 1994, WOODBURN 2000).



1. ábra – A *glyphosate* szerkezeti képlete
 Forrás: saját készítésű ábra a HTTP1 hivatkozás alapján.

A legszélesebb körben, a legtöbbet és a leggyakrabban felhasznált gyomirtó szer az egész világon, különös tekintettel az Amerikai Egyesült Államokban (USA) döntően a GM, *glyphosate* rezisztens (GR) növények esetében használják (BENBROOK 2016).

A *glyphosate* a hatásmechanizmusát tekintve a sikiminsav metabolikus útvonalat szakítja meg, amely a növényekben, baktériumokban, gombákban, algákban és néhány protozoában a folsav és az aromás aminosavak bioszintéziséért felelős. Az EPSP (5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát)-szintáz enzim katalizátorként működik abban a reakcióban, mely során sikimát-3-foszfátból és foszfoenol-piruvátból (PEP) EPSP-szintáz keletkezik, melyből később aromás aminosavak szintézise történik. A *glyphosate* kompetitív inhibitorként viselkedik a PEP-pel szemben, azaz az EPSP-szintáz enzimben elfoglalja a PEP kötőhelyét, ezzel megakadályozva a PEP enzimhez kötődését, illetve a sikiminsav reakció lezajlását (POLEGIONI *et al.* 2011, SCHÖNBRUNN *et al.* 2001). Az aromás aminosav-szintézis gátlásának következményeként leáll a sejtekben a fehérjészintézis, a sikiminsav koncentrációja toxikus szintre növekszik, közvetett hatásként leáll a fotoszintézis a kloroplasztiszokban (ORCARAY *et al.* 2010, STEINRÜCKEN & AMRHEIN 1980).

Az EPSPS enzim és az előállításáért felelős géncsalád (*ARO*) megtalálható a legtöbb prokarióta és alacsonyabb rendű eukarióta esetében (pl. *Saccharomyces cerevisiae*) is. Ezáltal a *glyphosate* felhasználható mikrobiális növekedési inhibitorként is (BRAUS 1991, LAROSSA & FALCO 1984). Kísérletes eredmények bizonyítják, hogy a *glyphosate* gátolhatja az EPSPS enzim működését az emberi bél mikrobiomban, módosítva az ott található mikroorganizmusok összetételét, ezáltal megváltoztatva a mikrobiom funkcióját (MESNAGE & ANTONIOU 2020, RUEDA-RUZAFÁ *et al.* 2019). Hím Sprague-Dawley patkányokat Roundup® Grand Travaux Plus készítménnyel környezeti koncentrációban (0,0001 mg/L) kezelve szintén változások voltak megfigyelhetőek az állatok mikrobiomjának összetételében és funkcióiban (LOZANO *et al.* 2018). A toxikokinetikai vizsgálatok megerősítik, hogy a *glyphosate* alacsony biológiai hozzáférhetőséggel rendelkezik, valamint lassan és rosszul szívódik fel patkányok

gasztrointesztinális traktusából. Fő bomlástermékének, az amino-metil-foszfonsavnak (AMPA) a képződését a mikrobiom tevékenysége befolyásolhatja (ANADÓN *et al.* 2009).

A *glyphosate* fizikai-kémiai megjelenése alapján gyenge szerves sav, színtelen, kristályos, szilárd vegyület, amely vízben jól oldódik (10,5 g/L 20°C-on). Poláris szerves oldószerekben gyakorlatilag nem (etanol, aceton), vagy csak részlegesen és gyengén (etil-acetát, metanol, xilol) oldódik (LAITINEN *et al.* 2007). Ammónium-, izopropil-amin-, nátrium-, kálium-, és trimetil-szulfónium egyértékű kationokkal az anyavegyületet *glyphosate*-sók formájában hozzák létre és helyezik forgalomba, ezúton növelve a *glyphosate*-sav oldhatóságát. A *glyphosate*-sók vízben való oldhatósága akár egy vagy két nagyságrenddel nagyobb, mint a szabad foszfonsavú *glyphosate*-é. A vízben való oldhatóságuk sorrendje: trimetil-szulfónium-só \cong izopropil-amin-só > kálium-só > nátrium-só > ammónium-só > *glyphosate*-sav (HTTP2, SZÉKÁCS & DARVAS 2012).

3.2.2 *Glyphosate*-alapú készítmények

A *glyphosate*-tartalmú készítmények esetében a növények felületén létrejövő hatóanyag tapadást, abszorpciót, valamint penetrációt először faggyúamin-származékokkal növelték és javították, közülük a polietoxilált faggyúaminnak (POEA) nevezett vegyületek csoportja világszinten, széles körben vált elterjedté és használttá, ezáltal a leggyakoribb formázó- és segédanyaggá (BRADBERRY *et al.* 2004). A *glyphosate*-alapú herbicidek káros biológiai hatásait az elmúlt évek során megannyi alkalommal ismertették. Beszámoltak aromataz enzim gátló, egyéb endokrin rendszert zavaró hatásairól, valamint citotoxicitásáról humán/ emlős sejtvonalakon (CASSAULT-MEYER *et al.* 2014, CLAIR *et al.* 2012, TELEKEN *et al.* 2019, YOUNG *et al.* 2015), genotoxicitásáról és citotoxicitásáról halakon (MARQUES *et al.* 2014, VERA-CANDIOTI *et al.* 2013) reprotoxikus hatásairól *Daphnia magna*-n (CUHRA *et al.* 2013), amelyeket POEA tartalmú készítmények okoztak. A legfrissebb tanulmányok a *glyphosate*-alapú készítményeket (különösen a Roundup[®] készítményeket, amikben POEA a formázóanyag) és az adjuvánsokat (POEA és alkil-poliglükózid) hormonális rendszert befolyásoló hatásuk miatt EDC-ként kategorizálták, már mezőgazdasági felhasználásban alkalmazott hígítás alatti koncentrációkban (DEFARGE *et al.* 2016, GASNIER *et al.* 2009, RICHARD *et al.* 2005).

A POEA-val formázott *glyphosate*-készítmények káros hatásai miatt az Európai Bizottság döntéshozói nem kívánatos összetevőnek minősítették a segédanyagot. A segédanyagot tartalmazó termékek nem engedélyezhetőek 2016-tól az EU tagállamaiban. A visszavont engedélyű termékek 2017. május 31-ig voltak forgalmazhatóak és 2017. november 30-ig felhasználhatóak. 2018-ig teljeskörű növényvédelmi gyakorlatból történő kivonásukig, Magyarországon 24 POEA-tartalmú *glyphosate*-alapú készítmény volt kereskedelmi

forgalomban. A hatóanyag gazdasági szempontú egyidejű védelme mellett hazánk elismerte a készítmények toxikológiai kritikáinak legitimitását. Az Európai Unió tagállamaiban 2016-tól kezdődően a faggyúamin csoportot számos más, inertnek gondolt összetevők váltották fel, melyeket a gyártók gyakran nem deklaráltak/deklarálnak és amelyekre a vonatkozó 1107/2009 számú EU Bizottsági Rendelet (1107/2009/EK) szerinti toxikológiai értékelés nem szükséges és nem létezik. A rendelet 27. cikke szerint tilos az emberi vagy állati egészségre, növényekre, növényi termékekre, talajvízre és a környezetre káros hatást gyakorló segédanyagok használata. A III. melléklet jegyzéke említi a nem engedélyezett segédanyagokat, azonban jelenleg nem listázza ezeket. Továbbá, általában azt feltételezik, hogy a segédanyagoknak függetlenül nincs sem jelentős toxikus, sem szinergikus hatása. Az első generációs polietoxilált aminokat (POEA típusú formázó szerek családja – kifejezetten Roundup® készítményekben – POE(15) faggyúaminként) követően, a *glyphosate*-alapú készítményeket alkilpoliglikozidokkal, nem-alkoxilezett felületaktív anyagokkal, nitrolillal, propoxilezett kvaterner ammóniummal, etoxilált éteraminokkal, vagy más formázó- vagy detergens anyagokkal formázták. Minderre azért volt szükség, hogy növeljék a hatóanyag stabilitását, tapadását, javítva a sejtekbe történő behatolását, közvetlenül a biológiai hozzáférhetőségét (BENACHOUR & SÉRALINI 2009, MESNAGE *et al.* 2019, NÉBIH 2016, SZÉKÁCS & DARVAS 2018, SZÉKÁCS *et al.* 2014, VANDENBERG *et al.* 2017). A POE(15)-nek ugyan nem, de az egyéb segédanyagokat tartalmazó készítmények toxicitásának, biológiai hatásainak vizsgálata még hiányos. Mivel a készítmények összetétele jogilag bizalmasnak minősülő kereskedelmi információk, a segédanyagok azonosításával és koncentrációjával kapcsolatos félreértés gyakori, a vizsgált anyagok leírása a publikált tanulmányokban gyakran hibás, vagy hiányos. A zűrzavaros állapot megoldása érdekében a növényvédőszer-termékek kémiai összetételének közzétételét javasolják és azt előíró törvények léphetnek életbe a közel jövőben (MESNAGE *et al.* 2019).

Magyarországon, 2018-ban a legtöbbet alkalmazott növényvédő szer készítmény a *glyphosate*-alapú Fozát 480® vízdoldható koncentrátum volt, melyet a gyommentesítés mellett állományszárításra is használtak, illetve szinte minden növénykultúrában alkalmazható volt (NAIK 2020) 2021.07.15-ig jelenleg szükséghelyzeti engedéllyel rendelkezik (egyedüliként) 2021.11.02-ig (HTTP3). A magyarországi peszticid piacon, 2021-ben elérhető *glyphosate*-alapú készítményből (POEA nélkül) 26 alapengedéllyel és 27 származtatott engedéllyel rendelkező szabadforgalmú (III. forgalmi kategóriás), bárki számára, növényvédelmi szakképesítés nélkül hozzáférhető készítmény található meg (HTTP3). Így a helyes növényvédelmi gyakorlat regulációja és megvalósítása a herbicidek alkalmazása során csak a csomagoláson szereplő előírásainak és utasításainak betartásától függ. Franciaországban, például a mezőgazdasági munkások önálló adalékanyagként használják a POEA-t (amelyet továbbra is engedélyeznek más

hatóanyagokat tartalmazó peszticid készítmények önálló segédanyagaként) keverik hozzá a permetezőtartály tartalmához (MESNAGE & ANTONIOU 2018).

3.2.3 *Glyphosate és glyphosate-alapú készítmények toxicitása, káros biológiai hatásai*

A *glyphosate* akut expozíció során irritációt okoz a szemben, bőrön, lenyelés esetén a felső emésztőszervekben, belégzés esetén a tüdőben, légutakban és köhögést vált ki. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatalának (US EPA) álláspontja szerint a *glyphosate* mérsékelt akut toxicitással (III. kategória) jellemezhető humán orális, dermális és nazális expozíció után (US EPA 1993), hasonlóan emlősállatok esetében, ahol nagyon alacsony akut toxicitással rendelkezik (US EPA 1992).

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) Nemzetközi Rákkutató Ügynöksége (IARC) 2017-es besorolása szerint emberre nézve valószínűsíthetőleg rákkeltő anyagként („2A” osztály), míg az US EPA 2004 óta bizonyítottan nem rákkeltő hatású anyagként („E” kategória) tartja számon. Az US EPA, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) és az IARC jelentősen eltérő ítéleteket hozott a *glyphosate* és a *glyphosate*-alapú herbicidek az emberen rákot okozó, vagy az ahhoz való hozzájárulásának lehetőségeiről, kockázatairól. Az US EPA és az európai szabályozók arra a következtetésre jutottak, hogy a tiszta, technikai minőségű *glyphosate*-sav hatóanyag nem jelent jelentős rák kockázatot az emberek számára, a jelenleg jóváhagyott élelmezési célú felhasználások és a lakosság várható étkezési expozíciós szintjei alapján (BENBROOK 2019, EFSA 2015, IARC 2017, US EPA 2016). *Per os* módon bejuttatott, *Charles River COBS CD* patkányokon végzett akut vizsgálatok alapján megállapították, hogy a technikai tisztaságú *glyphosate* LD₅₀/LC₅₀ értéke nagyobb, mint 5000 mg/ttkg. Teratogenitását vizsgálva 6-19 napos vemhességben járó patkányoknak 300-1000-3500 mg/ttkg-nak megfelelő mennyiségű *glyphosate* gyomorszondával történő bejuttatása után, megfigyelhető volt a gyakoribb hasmenés, légzési nehézségek, az ornyálkahártya irritációja és elhalálozás a legnagyobb dózist (3500 mg/ttkg) kapott csoportban. Ugyanezen kísérletben tapasztalható volt az a jelenség, hogy a nőstény állatok kevesebb egészséges utódot hoztak a világra, a NOAEL értéket 1000 mg/ttkg-ban állapították meg. Mutagén hatásait vizsgálva, a *glyphosate* önmagában nem mutagén hatású (WHO 1994).

TSUI & CHU (2003) a *glyphosate*, a POEA és a Roundup® készítmény ökotoxikológiai hatásait vizsgálták vízi ökoszisztémákból kiválasztott különféle modellfajokon. Az eredményeik alapján a POEA bizonyult a legtoxikusabb vegyületnek, ezt követte a Roundup® és végül a *glyphosate*-sav (1. táblázat). A toxikológiai/ökotoxikológiai vizsgálatok tesztorganizmei között jelenleg már nem szerepelhet sem a kétéltűek, sem a hüllők osztálya veszélyeztetett státusza miatt. Az *atrazine* gyomirtó után másodsorban a *glyphosate*-ról igazolták, hogy kétéltű és hüllő

fajokon kedvezőtlen, káros hatásokat mutat, valamint a POEA-val formázott készítményekről, hogy a POEA és a kisserelt termék(ek) káros mellékhatásai jelentősebbek, mint a tiszta hatóanyagé (BRADBERRY *et al.* 2004, DARVAS és SZÉKÁCS 2018) (**1. táblázat**). HOWE és mtsai. (2004) a *Rana pipiens* békafaj ebihalait különböző POEA-t tartalmazó készítmények - Roundup® Original, Roundup® Transorb, Roundup® Bioactive, Glyphos AU®, Glyphos BIO®, Touchdown® 480 - krónikus expozíciójának kitéve azt találták, hogy a fejlődési rendellenességeken túlmenően a kezelt állatok 15-20%-ának gonádjai abnormálisan fejlődtek és interszexuális jelleget mutattak. Az **1. táblázatban** szereplő hatásos, illetve letális koncentráció értékeket a hatóanyag esetében megfigyelve, valamint összevetve azokat a **3.2.4 fejezetben** leírt környezetben előforduló koncentrációkkal megállapítható, hogy a káros hatások a releváns környezeti koncentrációk alatt jelentkeznek. Azonban ezek a hatások a készítmények esetében a tényleges mezőgazdasági kijuttatási koncentrációk alatt fejeződnek ki.

PAGANELLI és mtsai. (2010) egy meg nem nevezett *glyphosate*-alapú készítmény teratogén hatásait vizsgálták *Xenopus laevis* és a *Gallus domesticus* embriókon. A *X. laevis* embriók hasonló fenotípusos jellegeket mutattak: a törzs és a fej mérete lerövidült, a szem nem fejlődött megfelelően vagy egyáltalán (*microphthalmia*), továbbá más koponya deformációk alakultak ki a későbbi fejlődési stádiumokban. A *G. domesticus* embriókon a rhomboméra-domének fokozatos elvesztését, látóhólyagok csökkenését, mikrocefália (kisfejűség) jelenségét figyelték meg. A *glyphosate* dózisfüggő mértékben válthat ki neurotoxicitást Wistar patkányokban, modulálva a szerotoninerget, dopaminerg és noradrenerg rendszereket (MARTÍNEZ *et al.* 2018). Humán eredetű neuroblasztóma SH-SY5Y sejtekre a *glyphosate* mellett az AMPA is citotoxikus volt, oxidatív stresszt váltott ki, valamint eltéréseket okozott az idegfejlődéssel és apoptózissal összefüggő gének transzkripciójában (MARTÍNEZ *et al.* 2020).

Számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálat igazolta már a *glyphosate* és a *glyphosate*-alapú készítmények endokrin diszruptor hatását, különösen állati és emberi sejtvonalakon. Megfigyelték a szteroidogenezis gátlását Leydig tumorsejtvonalon Roundup® akut expozíció után a StAR fehérje expressziójának megzavarásával (WALSH *et al.* 2000). Apoptózist és nekrozist indukált embrionális vese- és humán koriokarcinómasejt eredetű placentális sejtvonalakon (BENACHOUR & SÉRALINI 2009). A hatóanyag önmagában nem, viszont a készítmény gátolta a transzfektált humán hepatómasejtvonal transzkripciós aktivitását, valamint a humán mellrák sejtvonal androgén receptorain (antiandrogén aktivitás) is megnyilvánult az ED hatás (GASNIER *et al.* 2009). Az utóbbi évtizedben több más tanulmány mutatta ki a *glyphosate* és a *glyphosate*-alapú készítmények endokrin rendszert károsító hatásait azáltal, hogy ösztrogén aktivitást indukált az ER α és β expresszió megváltoztatásával, növelve egy ösztrogén válasz elem - luciferáz riporter gén (ERE-luc) expresszióját humán hormondependens emlőrák

sejtvonalon (MESNAGE *et al.* 2017, THONGPRAKAIKANG *et al.* 2013). A Roundup® a hormon szintek megváltoztatásával hormonális aktivitást mutatott, megszakítva a humán progeszteron szintézisét (WALSH *et al.* 2000).

1. táblázat: A *glyphosate*, POEA, *glyphosate*-alapú készítmények káros biológiai hatásai vízi, ökotoxikológiai tesztszervezeteken szakirodalmi adatok alapján.

Vegyület/készítmény	Készítmény kémiai összetétele	Tesztszervezet	Expozíció és hatás	Koncentráció	Irodalmi hivatkozás
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Aliivibrio fischeri</i> (baktérium)	15 perc EC ₅₀ bioluminiscencia gátlás	17,5 mg/L	TSUI & CHU (2003)
POEA	-			10,2 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			24,9 mg/L	
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Selenastrum capricornutum</i> (alga)	96 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	24,7 mg/L	
POEA	-			3,92 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			5,81 mg/L	
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Skeletonema costatum</i> (alga)	96 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	2,27 mg/L	
POEA	-			3,35 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			1,85 mg/L	
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoa)	40 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	648 mg/L	
POEA	-			4,96 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			29,5 mg/L	
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Euplotes vannus</i> (protozoa)	48 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	10,1 mg/L	
POEA	-			5,00 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			23,5 mg/L	
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (rákféle)	48 óra LC ₅₀ pusztulás	147 mg/L	
POEA	-			1,15 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			5,39 mg/L	
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Acartia tonsa</i> (rákféle)	48 óra LC ₅₀ pusztulás	35,3 mg/L	
POEA	-			0,57 mg/L	
Roundup®	GLY IPA-só 56,8%, POEA 15%			1,77 mg/L	
Glyfos®	GLY IPA-só 48%, POEA (nem deklarált)	<i>Scinax nasicus</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás torzfejlődés	2,64 – 4,78 mg/L 3 – 7,5 mg/L	LAJMANOV ICH <i>et al.</i> (2003)
<i>glyphosate</i> -sav	-	<i>Rana sp.</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás	> 38,9 mg/L	HOWE <i>et al.</i> (2004)
POEA	-	<i>Rana sp.</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás	1,1 – 2,2 mg/L	HOWE <i>et al.</i> (2004)
Roundup® Original	POEA 15%	<i>Rana sp.</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás	6,5 – 20,9 mg/L	HOWE <i>et al.</i> (2004)
Roundup® Transorb	POEA 15%	<i>Rana sp.</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás	7,2 – 7,4 mg/L	HOWE <i>et al.</i> (2004)
Roundup® Bioactive Touchdown® Glyfos BIO®	nem deklarált segédanyag 10-20%	<i>Rana sp.</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás	> 57,7 mg/L	HOWE <i>et al.</i> (2004)
Glyfos AU®	alkilamin etoxilát 3-7%	<i>Rana sp.</i> (farkatlan kétéltű)	24-96 óra LC ₅₀ pusztulás	28,6 – 29,1 mg/L	HOWE <i>et al.</i> (2004)
Roundup® Original Max	GLY K-só 49%, nem deklarált összetevő 51%	5 <i>Rana sp.</i> 2 <i>Bufo sp.</i> 1 <i>Hyla sp.</i> 1 <i>Pseudacris sp.</i> (farkatlan kétéltű)	96 óra LD ₅₀ pusztulás	0,8 – 2 <i>glyphosate</i> ekvivalens ² mg/L	RELYEA & JONES (2009)

² Szabad *glyphosate*-savban kifejezett koncentráció.

Roundup® Original Max	GLY K-só 49%, nem deklarált összetevő 51%	3 <i>Ambystoma sp.</i> 1 <i>Notophthalmus sp.</i> (farkos kétéltű)	96 óra LD ₅₀ pusztulás	2,7 – 3,2 <i>glyphosate</i> ekvivalens mg/L	RELYEA & JONES (2009)
-----------------------	---	--	---	--	-----------------------------

ROMANO és mtsai. (2010) tanulmánya alapján a Roundup® Transorb változásokat okozott a tesztoszteron bioszintézisében Wistar patkányokban, ám az ösztradiol szintjében nem. A Roundup® kétféle készítménye [Regular Roundup® Weedkiller (7,2 g/L *glyphosate*-sav; egyéb, inert összetevő), Roundup® Concentrate Weedkiller (360 g/L *glyphosate*-sav; egyéb, inert összetevő)] gátolta a progeszteron termelését (EC₅₀= 0,8 mg/L és 0,2 mg/L) humán korioplacenta sejtvonalon (YOUNG *et al.* 2015). Alacsonyabb tesztoszteron- és kortikoszteroid szintet regisztráltak hím patkányokban, csökkent spermiumszámmal és megváltozott morfológiával, beleértve a heréket is, Roundup® és Roundup® Original-lal történt kezelés követően (NARDI *et al.* 2017, PANDEY & RUDRAIAH 2015). Nőstény patkányokban különbségeket találtak az emlőmirigy (fokozott α -ösztrogénreceptor ESR1 aktivitás) és a petefészek fejlődésében (csökkent sejtosztódás), amelyek egybeesnek a detektált, alacsonyabb ösztradiol szintekkel (ALTAMIRANO *et al.* 2018). TELEKEN és mtsai. (2019) nőstény egereket 0,5%-os (5000 ppm) Roundup® Original DI (445 g/L *glyphosate* diammonium-só, 370 g/L *glyphosate*-sav) oldattal itatták a terhesség 4. napjától a szoptatási időszak végéig. A megszülető utódok súlya nem változott, de a herék hasüregből való leszállása (tesztoszteronképződés-függő folyamat) késett. A herék anatómiai képe változott, továbbá a herék caudális részén a *spermatozoa* szám is csökkent, miközben a herén belüli tesztoszteron-szint emelkedett. Mindez a luteinizáló hormon (lutropin, LH) szintjének emelkedése válthatta ki. Vizsgálataik szerint a készítménnyel való kezelés a terhesség és szoptatás után, mint anyán keresztüli hatás a F1 hímutódok csökkent termékenységét okozta. Véleményük szerint a vizsgált készítmény az anyai szervezeten keresztül is hormonmoduláns hatású, amely a hímutódok részleges meddőségéért felelőssé tehető. NEROZZI és mtsai. (2020) munkája során sertés spermiumainak működését és túlélését vizsgálta *glyphosate*-nak és a Roundup® Bioflow (360 g/L *glyphosate*-sav, 486 g/L *glyphosate* IPA-só, víz 42,5%, nem deklarált felületaktív anyag, 16%) készítménynek kitéve. A *glyphosate* 360 μ g/mL koncentrációban szignifikánsan csökkentette a hímivarsejtek motilitását, életképességét, mitokondriális aktivitását és az akroszóma integritását. A Roundup® Bioflow, hasonlóan a *glyphosate*-hoz, szignifikáns módon csökkentette a spermiumok mozgékonyágát, azok mitokondriális aktivitását és életképességét, valamint az akroszóma integritását ≥ 5 , ≥ 25 , illetve ≥ 100 μ g/mL *glyphosate*-ekvivalens koncentráció mellett már az inkubáció első órájában. A hatóanyag és a Roundup® sem rendelkezett káros hatással a spermiumok DNS integritására. Ezek az adatok együttevén azt mutatják, hogy mindkét anyag negatív hatást gyakorolt a hím gamétákra, a Roundup®

toxikusabb, mint a fő komponense, a *glyphosate* (NEROZZI *et al.* 2020). DEFARGE és mtsai. (2018) POEA-t nem tartalmazó készítmények aromatáz aktivitásáról számolt be JEG-3 sejtvonalon és sejttoxicitásról HEK293 sejtvonalon. Ezzel szemben az EFSA és az US EPA Endokrin Diszruptor Szűrőprogramja szerint (ESDP – Endocrine Disruptor Screening Program) információhiány, valamint nem elegendő és meggyőző bizonyíték miatt, (mivel az endokrin rendszerrel kapcsolatos ösztrogén és/vagy androgén jelátviteli útvonalakkal nem lép interakcióba) nem minősítette ED vegyületnek a *glyphosate*-ot (EFSA 2017a, US EPA OCSPP 2015).

2019-ben a Pesticide Action Network Europe (PAN Europe), valamint civil társadalmi szervezetek elérték az Európai Parlament (EP) környezetvédelmi döntéshozói körében, hogy vizsgálják felül a hormonmoduláns vegyületek (EDC-k) körét, mivel számos, kritikusan káros/negatív környezeti esemény (hím békák hermafrodita fejlődési iránya) és betegség (férfi meddőség, endometriózis, hormon-függő daganatok kialakulása) háttérében bizonyosan az ilyen hatású vegyületek állnak. Az EP úgy határozott, hogy határozottan kitar amellet, hogy magas szintű védelmet kell biztosítani az EDC-kel szemben, és felszólította az Európai Bizottságot, hogy legkésőbb 2020. júniusáig terjesszen elő jogalkotási javaslatokat. Emellet szükséges az EDC-k szélesebb körű horizontális szabályozása (beleértve az ismerteket és feltételezetteket), azonosítása megfelelő vizsgálatokkal és a legújabb tudományos ismeretek segítségével, a vegyi keverékek hatásainak figyelembevételével, valamint az emberi, állati és környezeti biomonitoring végrehajtásával. Az Európai Bizottság 2020. októberében közzétette vegyianyag-stratégiáját a fenntarthatóságért (Chemicals Strategy for Sustainability - CSS), amely szabályozási intézkedésekre vonatkozó ígéreteket tartalmaz az emberek és a környezet EDC-kitettségeének minimalizálása érdekében. A felülvizsgálat folyamata a Bizottság által évente megrendezésre kerülő, az endokrin rendszert károsító anyagokkal kapcsolatos nyomon követési intézkedések megvitatásának 3. éves fórumánál tart. Az intézkedések következményei súlyosan érinthetik a vegyipar azon szereplőit, amelyek a kereskedelmi peszticid termékeket gyártják (PESTICIDE ACTION NETWORK 2019, EUROPEAN COMMISSION 2021).

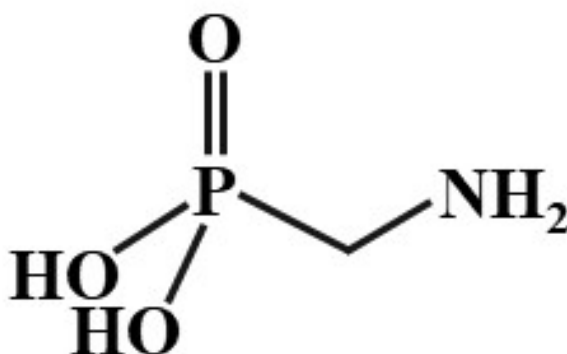
Emellet, az EU 2017-ben hozott döntése szerint, a *glyphosate*, mint növényvédelmi termékek körében alkalmazott hatóanyag felhasználása 2022. december 15-ig engedélyezhető (EUROPEAN COMMISSION, 2017).

3.2.4 *Glyphosate és az AMPA környezeti előfordulása, sorsa és degradációja*

A *glyphosate* erős talajbéli adszorpciója miatt a hosszú távú lebomlási folyamatok nem játszanak szerepet a hatóanyag biológiai hozzáférhetőségében. Eltérő különbségek figyelhetőek meg a laboratóriumi és terepi vizsgálatokban meghatározott felezési idők (DT₅₀) között.

Laboratóriumi körülmények között a felezési időt nagyon kedvezőnek találják, amely vízben 91 napra, talajban 47 napra tehető. Ezzel szemben a terepi vizsgálatok alapján az anyavegyület DT₅₀ értéke néhány naptól több hónapig terjedhet, vagy egyes kirívó esetekben akár egy évre is kitolódhat a talaj összetételétől függően. A 30-170 napra tehető fél-élet idejével mérsékelt perzisztens vegyületnek nevezhető. Az elhúzódó lebomlás oka részben a talajmátrixon való kötődésből adódik, amelyen keresztül a talajrészecskékre adszorbeálódott hatóanyag fémionokkal (Al, Fe, Mn, Zn) komplexeket képezhet. Mobilitása a talaj agyagásványok és szerves anyag mennyiségétől és minőségétől, pH értékétől, szerves foszfor tartalmától (foszfor tartalmú molekula révén versenyzik az elérhető kötődési helyekért), talajszemcsék között megtalálható vízben létrejövő ionos kötések erősségétől függ. Kötődése a talajszemcsékhez a kémhatás (pH) csökkenésével erősödhet (TOMLIN 2000, DARVAS és mtsai. 2011, SZÉKÁCS & DARVAS 2012, VAN BRUGGEN *et al.* 2018, VERECKEN 2005).

A növényekben, a vízben és a talajban a *glyphosate* elsődleges transzformációja, illetve bomlásterméke az AMPA [aminomethylphosphonic acid, CH₆NO₃P] (**2. ábra**), amely extrém nagy vízoldhatóságának (1466561 mg/L, 20°C-on) köszönhetően mobilisabb a talajban, mint az anyavegyület, ezáltal mélyebb talajrétegekben és felszín alatti vízbázisokban is gyakrabban kimutatható (HTTP5, MAQUEDA *et al.* 2017, SZÉKÁCS & DARVAS 2012).



2. ábra – Az AMPA szerkezeti képlete.

Forrás: saját készítésű ábra a HTTP4 hivatkozás alapján.

Egészen a 2000-es évekig a *glyphosate*-ot nem tekintették felszíni- és felszín alatti vízszennyezőnek az erős talajbéli adszorpciója és relatív alacsony mobilitási potenciálja miatt. Azonban viszonylagos nagy vízoldhatóságával az AMPA-val egyetemben, extrém heves esőzések után a csapadékkal bemosódva megjelennek nemcsak a mélyebb talajrétegekben, hanem a felszíni és talajvizekben egyaránt. Az esőzések mellett a talajerózió szintén szállíthatja azokat a talajrészecskéket, amelyek felületén a két vegyület szorbeálódott. Ezek a partikulumok a vizeket elérve leülepedhetnek és beépülhetnek az alsóbb üledékrétegekbe. A 2000-es évektől kezdődően, az európai országokban induló célzott monitoring programok eredményei szerint a

talajvízben és felszíni vízben a *glyphosate* maximális detektálható koncentrációja 24 és 50 µg/L, míg az AMPA-é 19 és 48,9 µg/L volt (HORTH & BLACKMORE 2009). A különböző környezeti mátrixok mellett gyakran kimutathatóak szennyvíztisztító telepek kifolyó, tisztított szennyvizéből, illetve az azt közvetlenül befogadó vízfolyások vizéből és üledékéből is. Az AMPA eredete azonban valójában nem meghatározható, mivel a *glyphosate*-on kívül más molekulák lebomlásából is származhat. Kevésbé ismert tény, de egyes foszfor-tartalmú mosószerke bomlásterméke is (SKARK *et al.* 1998, BOTTA *et al.* 2009). A mosószerkeben megtalálható egyes detergenske, felületaktív anyagok foszforsav-alapúak (másnéven foszfonátok), ilyen például a HEDP (1-hidroxietilén-1,1-difoszfonsav), az ATMP (aminotrimetilén-foszfonsav), az EDTMP (etiléndiamin-tetrametilén-foszfonát) vagy a DTPMP (dietilén-triamin-penta-metilénfoszfonsav), melyek bomlása során AMPA keletkezik (NOWACK 1997, JAWORSKA *et al.* 2002). A detergenske bomlása elsősorban biodegradációval valósul meg, de leírták már fotodegradációval és hidrolízissel történő degradációt is. Száraz, szinte esőmentes időjárás esetén megfigyelték, hogy a tisztított szennyvizet fogadó felszíni vizekben a mosószerke lebomlása jelenti az AMPA elsődleges forrását, illetve azt, hogy a szennyvíztisztító telepek hatása a *glyphosate* koncentrációjára kisebb, mint az AMPA koncentrációjára gyakorolt hatás (BOTTA *et al.* 2009).

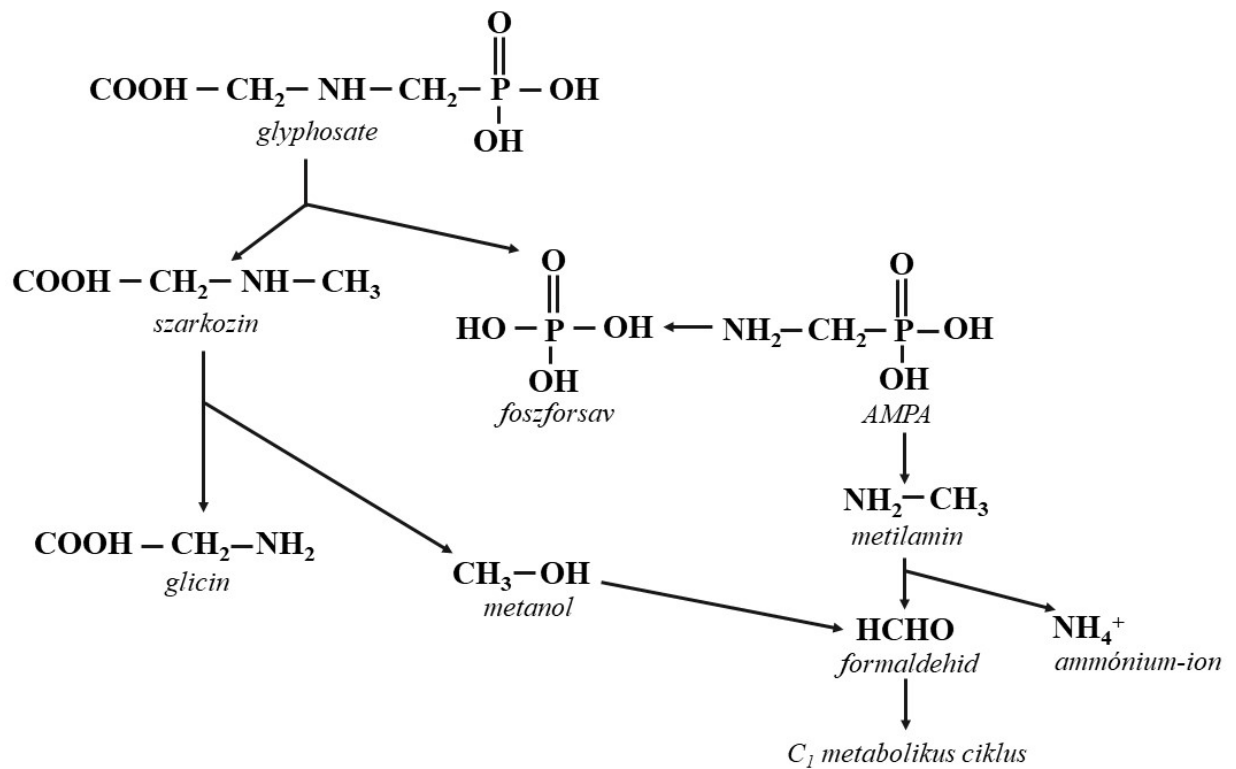
A felszíni és felszín alatti vizek elszennyezése az ivóvíz minőségét is veszélyeztetheti, mivel a szokásos víztisztítási eljárásoknak a növényvédő szerek koncentrációjára nincs különösebb hatása (SIHTMÄE *et al.* 2013, VAN BRUGGEN *et al.* 2018). Az EU-ban az ivóvíz alapvető minőségi előírásait összefoglaló 98/83/EK irányelv szerint a növényvédő szerek ivóvízben megengedett legmagasabb koncentrációja külön-külön 0,1 µg/L (*aldrin*, *dieldrin*, *heptachlor* és *heptachlor epoxide* esetén 0,03 µg/L), együttesen 0,5 µg/L lehet (azonban csak azokat a peszticideket kell ellenőrizni, amelyek az adott vízellátásban valószínűleg jelen vannak). A *glyphosate* és az AMPA, ennél az értéknél viszonylag magasabb koncentrációban mutatható ki az európai felszíni vizek (pl. magyarországi) jelentős részében (0,12–0,98 µg/L, ill. 2,8 µg/L) (MÖRTL *et al.* 2013, POPP *et al.* 2008). A *glyphosate* és az AMPA jelenléte az élővizekben a mezőgazdasági, kertészeti, illetve szőlőtermelő területeket körülvevő vízgyűjtő területeken az elfolyó, szennyezett („*run-off*”) vizek, illetve a permetezés utáni elsodródás miatt kritikusabb (*glyphosate*: 17–387 µg/L; AMPA: 4,5–49,4 µg/L) (SOLOMON *et al.* 2007, LEFRANCQ *et al.* 2017, LUTRI *et al.* 2020, MACLOUGHLIN *et al.* 2020).

A *glyphosate* bakteriális lebontása (biodegradáció) a talajban aerob és anaerob úton is megvalósul. A bomlás során glioxilát és AMPA keletkezik, melyek tovább bomlanak vízzé (H₂O), szén-dioxiddá (CO₂), ammóniává (NH₃) és foszfáttá (PO₄³⁻) (DICK & QUINN 1995a). Üledékben, abiotikus körülmények között végbemenő biodegradációja lassabb, mint oldott

állapotában, vízben (VAN BRUGGEN *et al.* 2018). A foszfonsav típusú *glyphosate* molekulát közvetlen szén-foszfor (C–P) kötés jellemzi. A C–P kötés kémiai és termikus szempontból nagyon stabillá és ellenállóvá teszi a molekulát a nem-biológiai (abiotikus) környezeti körülmények között (HAYES *et al.* 2000, SINGH & WALKER 2006). A talajban zajló transzformációs folyamatok szempontjából a mikrobiális degradációt tekintik a legfontosabb folyamatnak (ARAUJO *et al.* 2003). A *glyphosate* mineralizációja a talajban élő mikroorganizmusok aktivitásával és biomasszájával kapcsolatos (WIREN-LEHR *et al.* 1997). A C-P kötés defoszforilálódás folyamatával hasítható, amelyet C-P liáz enzimek katalizálnak. Az AMPA lassabban bomlik tovább, mint az anyavegyület (ARAUJO *et al.* 2003, FORLANI *et al.* 1999, SINGH & SINGH 2014).

Az elmúlt évtizedek kutatásai során számos baktériumnemzetség képviselőjét, nemzetséghez tartozó fajtát izolálták a környezetből, melyek képesek degradálni a *glyphosate*-ot kometabolikus úton, ill. szén- vagy foszforforrásként hasznosítva az életfolyamataikban (NOUROUZI *et al.* 2011, Singh & Walker 2006). Többek között a *Pseudomonas* fajok képviseltetik magukat (MOORE *et al.* 1983, TALBOT *et al.* 1984, JACOB *et al.* 1988, QUINN *et al.* 1989), de hasonlóképpen megjelennek a *Flavobacterium sp.* (BALTHAZOR & HALLAS 1986), az *Alcaligenes sp.* (TALBOT *et al.* 1984), *Bacillus megaterium* 2BLW törzse (QUINN *et al.* 1989), több *Rhizobium sp.* (LIU *et al.* 1991), három *Agrobacterium sp.* (WACKET *et al.* 1987, LIU *et al.* 1991), egy *Arthrobacter sp.* (PIPKE *et al.* 1987), *Ochrobactrum anthropi* GPK3, (ERMAKOVA *et al.* 2010, SVIRIDOV *et al.* 2012), *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20 (OBOJSKA *et al.* 2002), *Achromobacter sp.* MPS 12A és Kg 16 jelű törzsei (ERMAKOVA *et al.* 2010, SVIRIDOV *et al.* 2012), melyek bontják a herbicidet.

A kutatásokból nyert megfigyelések arra utalnak, hogy a hatóanyag lebontásában számos különféle talajmikroorganizmus vesz részt, valamint a degradációs lépések különböző mikroorganizmusokat érintenek, amelyek különböző bomlástermékeket használnak fel energiaforrásként. Az AMPA mellett, elsődleges bomlástermékeknek számít a szarkozin, valamint a foszforsav. A *glyphosate* lebomlásának lehetséges útvonalait és biodegradációs termékeit a **3. ábra** szemlélteti (SINGH & WALKER 2006, SINGH & SINGH 2014).



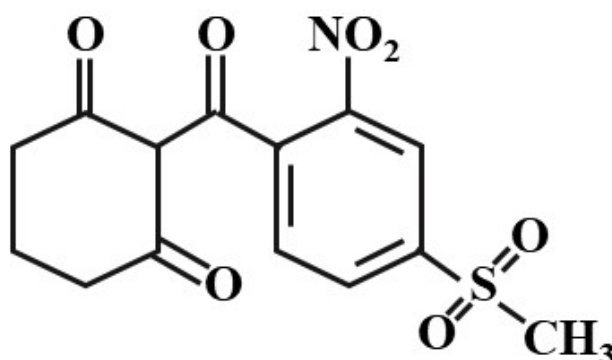
3. ábra A *glyphosate* lebomlási útvonalai
 Forrás: saját készítésű ábra SINGH & WALKER 2006 munkája alapján.

3.3 Mesotrione bemutatása

3.3.1 A mesotrione jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paramétere

A *mesotrione* [2-(4-mesyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione, $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_7\text{S}$] egy β -triketon típusú szelektív, szisztémikus hatású, pre- és posztmergensen alkalmazható herbicidek közé tartozó, ciklohexándion-gyűrűt tartalmazó karbonil vegyület, mely három karbonil- és egy nitro-csoportot tartalmaz (4. ábra). A β -triketon vegyületcsoportba tartozó herbicideket az *atrazine* pótlása miatt vezették be és ajánlották az EU országokban (BARCHANSKA *et al.* 2016). Hatásmechanizmusát tekintve a HPPD (4-hidroxifenilpiruvát-dioxigenáz) enzim inhibitora a karotinoidok bioszintézisében (pigmentképződés gátlás). A HPPD enzim a karotinoidok bioszintézisének egyik alkotóeleme, amely a tirozint plasztokinonná és α -tokoferollá alakítja. A plasztokinon kritikus kofaktor a fitoén-deszaturáz enzim számára, amely szintén a bioszintézis útjának egyik alkotóeleme. A szintézis útvonalának megzavarásával egyes kétszikű és egyszikű, lomblevelű és fűfélékhez tartozó gyomnövények kifehéredését (klorofill bomlás), majd száradásos elhalását okozza. A molekula a citromillatú kefevirág (*Callistemon citrinus*) által termelt leptospermon nevű fitotoxin - gyökérnedv szintetikus analógja. A cserje gyökérnedve a gyomok csírázását gátolja. A gyomirtó tulajdonságáért, legtöbbit a szántóföldi kultúrnövények közül a kukorica kultúrákban alkalmazzák. Használható mind konvencionális művelésű, mind „no-till” – talajművelés nélküli területeken, valamint *glyphosate*-rezisztens kukoricában, *glyphosate*-toleráns gyomnövények ellen. (BROSNAN *et al.* 2011, JAMES *et al.* 2006, JÓZSEF & RADVÁNY 2013, MITCHELL *et al.* 2001, PILEGGI *et al.* 2011).

Fizikai megjelenését tekintve sárgásbarna szilárd halmazállapotú por, mely magas vízoldhatósággal bír (1500 mg/L, 20 °C-on), valamint nagyon jól oldódik szerves oldószerekben is (aceton, etil-acetát, toluol, xilol) (PESTICIDE PROPERTIES DATABASE 2020).



4. ábra: A *mesotrione* szerkezeti képlete.
Forrás: saját készítésű ábra a HTTP6 hivatkozás alapján.

Hazánkban 1998-ban a Callisto® 4 SC nevű készítményben jelent meg először herbicid hatóanyagként, jelen állás szerint 19 alap- és 11 származtatott engedéllyel rendelkező készítmény tartalmazza (JÓZSEF & RADVÁNY 2013, HTTP3). A *mesotrione* az *S-metolachlor*-ral és a *terbuthylazine*-nal gyomirtó hatásban egymás szinergista vegyületei, gyakran alkalmazzák őket kombinációkban (PANNACCI & ONOFRI 2016, SUTTON *et al.* 2002). A triketon csoportba tartozó herbicidek a világon a második legtöbbet értékesített növényvédő szerek közé léptek fel 2010-ben (BARCHANSKA *et al.* 2016).

3.3.2 *Mesotrione* toxicitása, káros biológiai hatásai

Egészségügyi kockázatát tekintve alacsony/mérsékelt (III./IV. toxicitási kategória) akut toxicitással rendelkezik orális, dermális és inhalációs expozíciós utakon keresztül, enyhe szemirritáló hatással rendelkezik, de a bőrt nem irritálja, vagy szenzibilizálja (US EPA 2015).

Toxicitását tekintve a rendelkezésre álló kutatási eredmények alapján nem rendelkezik *in vivo* és *in vitro* tesztekben mutagén, karcinogén, reprodukciós és fejlődési rendellenégeket okozó hatásokkal. Neurotoxikus hatásai azonban lehetnek, a vegyület elsődleges célszervei a szemek, máj, vesék, melyekben a megfigyelhető káros elváltozásokat feltehetően a *mesotrione* HPPD gátló hatása révén a vérben megemelkedő tirozin-szint befolyásolja (HALL *et al.* 2001). A megemelkedett tirozin koncentráció hatással lehet az idegrendszer fejlődésére gyermekekben, illetve egyes, tirozinémia (recesszív autoszomális betegség, mely HPPD deficienciával jár, ami magas tirozinszintet eredményez a plazmában) III típusban szenvedő betegek mentális retardációt és neurológiai tüneteket mutattak. Az EFSA szerint hormonháztartást zavaró hatásai lehetnek, azonban a szakirodalom nem számol be ezekről. Az endokrin rendszert zavaró anyagokat összefoglaló Illinois EPA, Keith, Colborn, Benbrook, Danish Inert, EU listákon a vegyület nem szerepel (PESTICIDE PROPERTIES DATABASE 2020, EFSA 2016, US EPA

2001a). Az előírásoknak megfelelő felhasználás esetén nincs jelentős kockázata az emberekre és más nem-célszervezetekre vagy a környezetre nézve (CARLES *et al.* 2017).

A talajlakó cianobaktériumok gyakorta részt vesznek a nitrogén megkötésében, ily módon tápanyaggal gazdagítva a talajokat. Ezek a fotoszintetizáló baktériumok számos anyaggal, mint például exopoliszacharidokkal javítják a talaj szerkezetét. A HPPD enzimek hasonló szerepet töltenek be a cianobaktériumoknál, mint a növényeknél. CROUZET és mtsai. (2013) a HPPD enzim gátló *mesotrione* toxikus hatását vizsgálták mezőgazdasági csernozjom talajok cianobaktérium közösségein. Vizsgálatuk során a Callisto® készítmény és a *mesotrione* hatóanyag szántóföldekre javasolt kijuttatási mennyiség (0,45 mg/kg) egyszeresét, tízszeresét és százszorosát használták fel. Tudományos munkájuk eredménye kapcsán azt kapták, hogy a készítmény és a *mesotrione* hatóanyag tízszeres és százszoros kijuttatási koncentrációja negatív hatásokat gyakorolt a cianobaktériumok klorofill tartalmára, valamint a genetikai szerkezetére és diverzitására. Tízszeres mennyiségben kijuttatott szántóföldi dózisonál (4,5 mg/kg cc. a talajban), szignifikáns mértékben befolyásolta a mikrobiálisan mediált nitrogén transzformációt, megbontva az egyensúlyt a nitrifikációs és denitrifikációs folyamatok között (CROUZET *et al.* 2015). A talajban élő cianobaktériumok mellett más hatásviselőn is negatív hatásokat okozott, oxidatív stresszt és DNS károsodást indukált az *Eisenia fetida* (földigiliszta) tesztszervezetben 10 mg/kg koncentrációnál (ZHANG *et al.* 2019).

Ökotoxikológiai, vízi szervezetekre gyakorolt hatásokról (tisztá hatóanyag, bomlástermékei, *mesotrione*-alapú készítmények) számos tanulmány született, melyeket a **2. táblázatban** foglaltam össze. Mélytengeri baktérium biolumineszcenciáját, *protozoa*-k és algák növekedését gátolták (BONNET *et al.* 2008, BATISSON *et al.* 2010), csökkentették egyes alga fajok fotoszintetikus képességeit (NI *et al.* 2014), halakban DNS károsodásokat, enzimrendszerekükben változásokat okoztak, reaktív oxigén gyököket képeztek már környezetileg releváns koncentrációknál is (30, 115, 180 és 460 µg/L) (PIANCINI *et al.* 2015, WANG *et al.* 2018). Szakirodalmi adatok és az Európai Parlament és Tanács véleménye alapján a bomlása során az anyavegyületnél toxikusabb metabolitok jelenhetnek meg (EUROPEAN COMMISSION 2003). Az Európai Parlament és Tanács vegyi anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet (CLP rendelet) víz veszélyességi szempontból történő besorolási rendszere a *mesotrione*-t a rendeletben megadott „H” jelzésű figyelmeztető mondatok közül a H400 (nagyon mérgező a vízi élővilágra) és a H410 (nagyon mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz) kategóriába sorolta.

2. táblázat: A mesotrione, bomlástermékei (AMBA, MNBA) és mesotrione-alapú készítmények káros biológiai hatásai vízi, ökotoxikológiai tesztszervezeteken szakirodalmi adatok alapján.

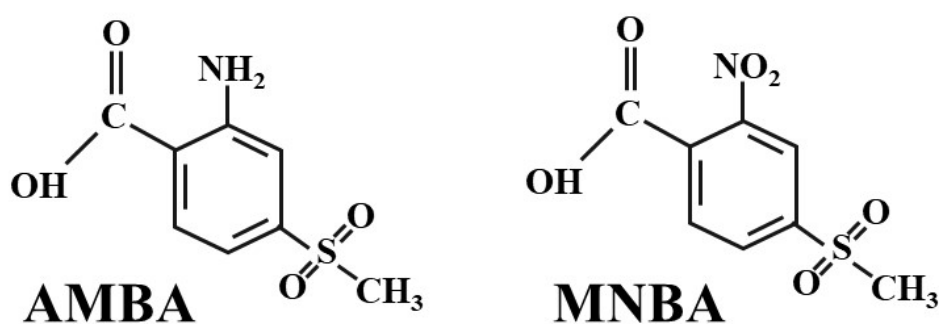
Vegyület/készítmény	Tesztszervezet	Expozíció és hatás	Koncentráció	Irodalmi hivatkozás
mesotrione	<i>Aliivibrio fischeri</i> (baktérium)	15 perc EC ₅₀ biolumineszcencia gátlás	43,6 ± 2,4 mg/L	BONNET <i>et al.</i> (2008)
AMBA			17,8 ± 4,0 mg/L	
MNBA			37,7 ± 2,1 mg/L	
Callisto®			1 mg/L	
mesotrione	<i>Aliivibrio fischeri</i> (baktérium)	15 perc EC ₅₀ biolumineszcencia gátlás	69,2 ± 4,0 mg/L	BATHISSON <i>et al.</i> (2010)
AMBA			12,6 ± 3,0 mg/L	
MNBA			312,7 ± 35,5 mg/L	
mesotrione	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoa)	9 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	7728 ± 1247 mg/L	BONNET <i>et al.</i> (2008)
Callisto®			4 ± 0,1 mg/L	
mesotrione	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoa)	45 perc EC ₅₀ növekedés gátlás	322,7 ± 43,9 mg/L	BATHISSON <i>et al.</i> (2010)
AMBA			> 125 mg/L	
MNBA			> 125 mg/L	
mesotrione	<i>Microcystis sp.</i> (alga)	96 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	6,19 mg/L	NI <i>et al.</i> (2014)
mesotrione	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (alga)		4,41 mg/L	
mesotrione	<i>Microcystis sp.</i> (alga)	7 nap csökkent fotoszintetikus képességek	0,05 – 10 mg/L	NI <i>et al.</i> (2014)
mesotrione	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (alga)			
mesotrione	<i>Oreochromis niloticus</i> (hal)	96 óra DNS károsodás (eritrocita, máj, kopoltyú)	115 és 460 µg/L	PIANCINI <i>et al.</i> (2015)
mesotrione	<i>Geophagus brasiliensis</i> (hal)	96 óra DNS károsodás (eritrocita, máj, kopoltyú)	30, 115 és 460 µg/L	PIANCINI <i>et al.</i> (2015)
mesotrione	<i>Cyprinus carpio</i> (hal)	28 nap szuperoxid-dizmutáz és kataláz enzim aktivitás-, reaktív oxigén gyökök szintjének emelkedése, DNS károsodás	180 µg/L	WANG <i>et al.</i> (2018)

3.3.3 Mesotrione környezeti előfordulása, sorsa és degradációja

Kémiai tulajdonságainál fogva gyenge sav, ezáltal erősen adszorbeálódik a savas kémhatású talajok szerves anyagához. Környezeti profilját tekintve széleskörű és gyors mikrobiológiai, fotolitikus bomlással rendelkezik (BARCHANSKA *et al.* 2016, JAMES *et al.* 2006). Biológiai értelemben vett perzisztenciája az agyag talajokban a legrövidebb, ezt követi a nehéz homokos-agyag, homokos és homokos agyag talajok. Alacsony mértékű alkalmazása rövidebb perzisztenciájú időszakot eredményezhet (CARLES *et al.* 2017). Talajokban a DT₅₀ értéke 4,5 - 34 napig terjedhet, amely a talaj pH-tól és szerves anyag mennyiségétől függ (CROUZET *et al.* 2010, DYSON *et al.* 2002). Az elsők között megjelenő kutatások, a fél-élet idejét a talaj felső 0-10 cm-ig terjedő rétegében 50 nap körüli időtartamra becsülték (ROUCHAUD *et al.* 2000).

A herbicid a környezetben instabil, a talajban és a vízben röviddel az alkalmazása után detektálható. Gyorsan bomlik, és a talajból eluálódva, az esővíz a felszíni vízbe továbbítja. Mindezek ellenére 1,8 µg/L koncentrációban mutatták ki haszonnövények melletti csatorna folyóvizében (BARCHANSKA *et al.* 2012). Észak-Amerikában, Kanadában az intenzív mezőgazdasági gyakorlatnak köszönhetően az eddigi legnagyobb felszíni, elfolyó vízben kimutatott koncentrációja elérte a 4,1 µg/L-t (CHRÉTIEN *et al.* 2017).

A *mesotrione* két fő bomlásterméke az AMBA [2-amino-4-methylsulfonylbenzoic acid] és az MNBA [4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid, C₈H₇NO₆S], amelyeket talajokban és növényekben megjelenve írtak le jellemzően (5. ábra) (BARCHANSKA *et al.* 2012). Az AMBA és MNBA felszíni vizekből való kimutatásával rendkívül csekély számú kutatás foglalkozik. Ennek az egyik oka az lehet, hogy ezeknek a metabolitoknak a meghatározása többlépcsős, bonyolult tisztítási/izolációs/redukciós fázisokon alapuló folyamatok összessége, precíz ellenben költséges eljárás. Ezért a jelenkori, kémiai-analitikai kimutatásuk és vizsgálatuk nem túl gyakori és elterjedt a környezetvédelemben. Az AMBA-t egy költőtóból gyűjtött vízből mutatták ki Lengyelországban. A maximális koncentrációját 29 µg/L-ben állapították meg március hónapban, majd 6 hónappal később 18 µg/L-re csökkent a mennyisége. Az AMBA-koncentráció lassú csökkenésének az oka a tó és mellékfolyói közötti lassú vízcserének, valamint a magas környezeti stabilitásának köszönhető (az összes triketon típusú herbicid bomlásterméke közül a legnagyobb). Az MNBA-t egy vízvezető árokából származó vízből detektálták 147 µg/L maximális koncentrációban. Bár koncentrációjuk relatíve magas volt, azonban az átmeneti jellegű megjelenésüket erősen befolyásolta a csapadék mennyisége (BARCHANSKA *et al.* 2017).



5. ábra: Az AMBA és az MNBA szerkezeti képlete.
 Forrás: saját készítésű ábra BONNET *et al.* 2008 munkája alapján.

Amióta a *mesotrione* a növényvédő szer piacon jelen van, csupán csak néhány mikroorganizmusról írták le, hogy képes metabolizálni (DURAND *et al.* 2006a, DURAND *et al.* 2006b, BATISSON *et al.* 2009; PILEGGI *et al.* 2012, OLCZHANHESKI *et al.* 2014). Többségük a *Bacillus* nemzetséghez tartozó baktériumfaj. A *mesotrione* részletes biodegradációs útvonalát ezeknek a mikroorganizmusoknak a meghatározásával térképezték fel (DURAND *et al.* 2010,

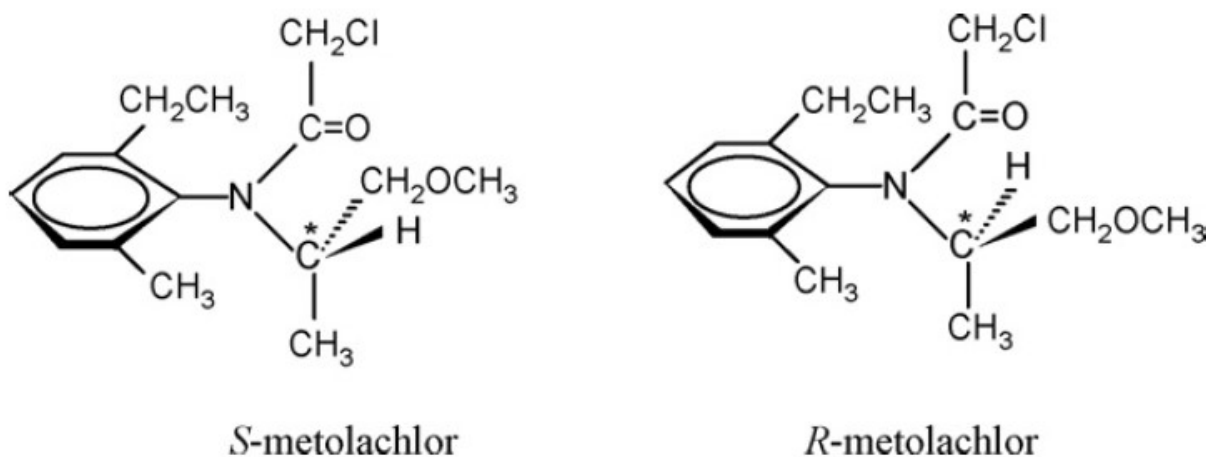
PILEGGI *et al.* 2012). DURAND és mtsai. (2006a), (2006b) biodegradációjára képes *Bacillus sp.* 3B6 törzset izoláltak, amely teljes mértékben és gyors ütemben bontotta el a vegyületet, 3 metabolitot képezve, köztük az AMBA-t is. A fő degradációs útvonal a nitro-csoport redukív transzformációján keresztül az AMBA-t eredményezte. Az alárendelt lebomlási útvonala során az oxidatív hasítást a nitro csoport redukciója követte, mely során az AMBA közvetlenül jelent meg. Hasonló degradációs útvonalakat állapítottak meg a kiváló bontási profillal rendelkező *Bacillus sp.* Mes11 törzsnél. Az izolátum 50 és 24 órás inkubáció után teljes mértékben lebontotta a *mesotrione* 0,1 mM-os (33,93 mg/L) és 1 mM-os (339,3 mg/L) koncentrációját (BATISSON *et al.* 2009). BATISSON és mtsai. (2010) által izolált 30 baktériumfaj legalább 15%-os hatékonysággal tudta biotranszformálni a vegyületet 5 napos inkubáció során, melyek közül a *Bacillus* nemzetség képviselői voltak túlnyomó többségben. Egy 2012-ben megjelenő tanulmányban PILEGGI és mtsai. (2012) egy *mesotrione*-nal szennyezett brazil, mezőgazdasági kukorica vetésterületének közelében lévő tóból és folyóból vett vízmintából izolálták a *Pantoea ananatis* baktériumot. A baktérium 18 óra alatt teljes mértékben lebontotta a herbicidet az AMBA és MNBA köztes bomlástermékei nélkül. A *Pantoea ananatis* nem tudta szénforrásként hasznosítani a vegyületet, degradációja kometabolikus folyamat, amelyhez glükózra van szüksége energiaforrásként. A szerzők külön kiemelték azt a tényt, miszerint először írtak le Gram-negatív baktériumot, amely a növényvédő szer bontására képes és bioremediációs eljárásokban is alkalmazható lehet. 2015-ben kínai kutatók azonosították a *Bacillus pumilus* HZ-2 jelű törzset, mely képes a hatóanyagot szénforrásként felhasználni. A magasabb kiindulási koncentrációjú kezelésekkel összehasonlítva az alacsonyabb koncentrációknál a lebomlás jelentősebb és hatékonyabb volt, ami lehetővé tette a törzs számára, hogy kevesebb maradékanyagot képezzen. A talajból a *mesotrione* eltűnése számos szerves közttermék és ionos melléktermék képződését eredményezte. Metabolizációjának az egyik fő útja a nitro funkciós csoport redukációján keresztül a konstitutívan termelődő és az oxigénre érzéketlen nitroreduktáz enzim segítségével valósult meg, amely köztes hidroxil-amino-származékokat eredményezett, mint például az AMBA-t (LIU *et al.* 2015).

3.4 S-Metolachlor bemutatása

3.4.1 Metolachlor*/S-metolachlor jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paraméterei

A *metolachlor** (2-chloro-N-(6-ethyl-o-tolyl)-N-[(1RS)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide, C₁₅H₂₂ClNO₂) molekula négy stabil sztereoizomerrel rendelkezik. Az eredeti *metolachlor* formuláció azonos mennyiségben tartalmazta a gyomirtó aktivitásért felelős (S)- (~50%) és az (R)-izomert (~50%) (6. ábra). A *metolachlor** S-izomerje, több mint kétszer akkora herbibicid

aktivitással rendelkezik, mint a racém formája. Az *S*-metolachlor (2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-((1S)-2-methoxy-1-methylethyl)acetamide, C₁₅H₂₂ClNO₂) a klór-acetamidok család tagjaként való használata egyre meghatározóbbá vált a racém molekula 1997 óta történő leváltása után, Magyarországon 1998 óta engedélyezett, de használata csak 2004-től vált hangsúlyossá (LIU & XIONG 2009, POIGER *et al.* 2002, ZHAN *et al.* 2006, PETHŐ 2015, PESTICIDE PROPERTIES DATABASE 2020).



6. ábra: Az izomer formái és szerkezeti képletei az *S*-metolachlor-nak és a racém (*R*)-metolachlor-nak
Forrás: LIU & XIONG 2009.

A hatásmechanizmusa során a gyomnövények hosszú láncú zsírsav bioszintézisét akasztja meg, valamint a gibberellin- és klorofillszintézisében szerepet játszó fehérjék, enzimek működésének gátlásán keresztül fejt ki (kontakt hatású csírázásgátló) herbicidhatását a célnövényben. Hatása más fontos útvonalakat is érint, amelyek felelősek a geranil-geranil-pirofoszfát β -karotinba és α -karotinba történő átalakulásáért. Általában egyszikű gyomok irtására alkalmazzák kalászos növény-, illetve kukorica kultúrákban. Az Egyesült Államok középnyugati részein az egyik leggyakrabban alkalmazott szelektív, széles spektrumú preemergens herbicid főként kukorica, szója és gyapot kultúrákban (GÖTZ & BÖGER 2004, LOWRY *et al.* 2013, NEVES *et al.* 2015, RIVARD 2003, SHANER *et al.* 2006).

A hatóanyagokra számított 2010-2013. évi közötti forgalmi adatok alapján összesen 514 ezer kg-ot használtak fel belőle Magyarországon, ami egy készítményre számítva a legnagyobb a hatóanyagok közül. A legfrissebb, 2019. évi NÉBIH által közölt növényvédő szerforgalmi jelentés alapján a lista 3. helyén a maga több, mint 373 tonnás mennyiségével a *glyphosate* (1596 t) és a kén (708 t) mögött szerepel (NÉBIH 2019). Jelenlegi állapot szerint 8 alapengedéllyel (Basar[®] Plus, Basar[®] 960 EC, Camix[®], Dual Gold[®] 960 EC, Gardoprim Plus Gold[®], Grand Total[®] 960 EC, Lumax[®], Lumax[®] H 537,5 SE) rendelkező készítmény tartalmazza, melyek közül egy *mesotrione*-nal, kettő *terbuthylazine*-nal, kettő pedig *mesotrione*-nal és *terbuthylazine*-

nal kombinált. További 8 készítmény párhuzamos engedéllyel, ezek közül 4 *terbuthylazine*-t is tartalmaz az *S-metolachlor* mellett (HTTP3).

A klór-acetanilid-származékok közül a legperzisztensebb vegyületnek számít és a viszonylag magas vízoldhatóságának (480 mg/L 20 °C-on) köszönhetően könnyen bekerül a felszíni- és a talajvizekbe (RIVARD 2003, PESTICIDE PROPERTIES DATABASE 2020, PETHŐ 2015).

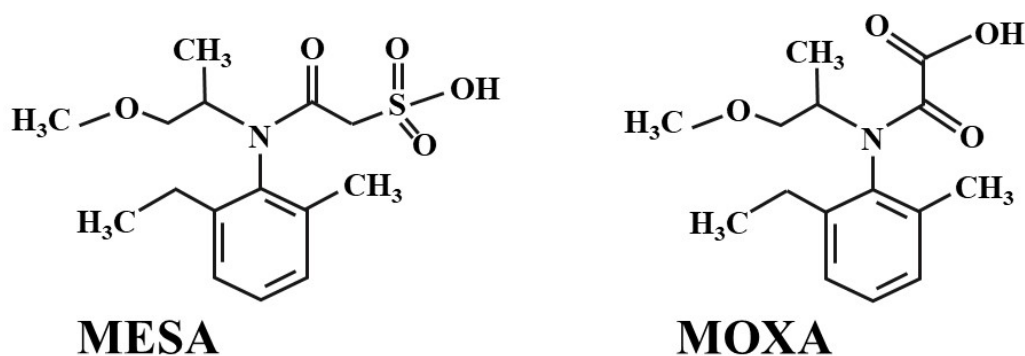
3.4.2 *Metolachlor/*S-metolachlor* toxicitása, káros biológiai hatásai**

A *metolachlor** mérsékelt akut toxicitással (III. kategória) rendelkezik orális, dermális és inhalációs expozíciós utakon. Rákkeltő tulajdonság tekintetében az Egyesült Államok EPA listája alapján, embereken lehetséges rákkeltő kategóriába (C csoport) sorolt vegyület. Lawrence Keith 1998-ben megjelent környezeti endokrin diszruptorokat összefoglaló könyvében (Keith listán) megtalálható. Azonban a Keith lista már nem egy naprakész adatbázis, nem megfelelő tudományos bizonyítékok hiánya miatt az *S-metolachlor* csak gyanúsítható hormonháztartást zavaró hatását illetően (RUSIECKI *et al.* 2006, US EPA 2001b).

Számos epigenetikai tanulmány foglalkozik a *metolachlor** nem célszervezetet érő hatásaival. *Metolachlor**-t is tartalmazó herbicid keverék expozíciónak kitett gyermekek esetében megfigyelték, hogy különböző típusú daganatok (agydaganat, leukémia, limfómák) kialakulásának valószínűsége megemelkedett (THORPE & SHIRMOHAMMADI 2005), gyomirtó szer felhasználók között pedig *metolachlor** expozíció hatására megnőtt a kockázata a tüdő- és prosztaták kialakulásának (RUSIECKI *et al.* 2006). Noha eddig semmilyen specifikus mechanizmust nem írtak le, melyek a vegyület a nem célszervezetekre kifejtett hatását igazolja, számos tanulmány feltételezi, hogy ezen folyamatok lejátsszódásában szerepet játszik a fehérjeszintézis és metabolizmus-gátló hatása (ZAHN *et al.* 2006). HARTNETT és mtsai. (2013) szerint humán HepG2 májsejtek növekedésére a *metolachlor** már alacsony koncentrációban gátló hatással bírt. LOWRY és mtsai. (2013) azt találták, hogy a vegyület már a környezetben is előforduló koncentrációban (0,05-0,1 mg/L) csökkenti a HepG2 sejtek számát, az expozíció azonban nem apoptózishoz vezet, hanem a sejtosztódási ciklusban résztvevő fehérjékre van hatással, mely végül a sejtciklus lelassulásához/megállásához vezet. Más tanulmányok szerint a hatóanyag sejtoxikus volt humán limfocitákra és hepatocitákra is (ROLLOF *et al.* 1992, KALE *et al.* 2008). Az emberi eredetű placentáris koriokarcinómasejt JEG3 sejtvonalon az aromáz aktivitást megnövelte, valamint aromáz mRNS induktor hatásának bizonyult (LAVILLE *et al.* 2006). Továbbá humán PXR (Pregnane X Receptor) agonistának, aktivátornak bizonyult. A PXR olyan sejtmagreceptor, melynek elsődleges funkciója, hogy érzékelje az idegen toxikus anyagok jelenlétét a szervezetben, erre pedig úgy reagál, hogy ezen anyagok detoxifikációjában szerepet játszó fehérjék expresszióját növeli (LEMAIRE *et al.* 2006). Juvenilis, hím patkányokkal végzett

etési kísérletben 50 mg/ttkg *metolachlor** a szérumban tesztoszteron-, valamint ösztadiol szintjét szignifikánsan megnövelte a kontroll egyedeknél mért értékekhez képest 88, illetve 300%-kal. Ugyanebben a vizsgálatban 5 mg/ttkg *metolachlor** hatására csökkent a szérumban dihidrotesztoszteron szintje, valamint mindkét koncentrációjú expozíció során nőtt az FHS hormon szintje (MATHIAS *et al.* 2012).

Elsődleges bomlástermékei a *metolachlor* etánszulfonsav [2-[2-ethyl-N-(1-methoxypropan-2-yl)-6-methylanilino]-2-oxoethanesulfonic acid, C₁₅H₂₃NO₅S] (MESA) és a *metolachlor* oxanilsav [N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-oxalamic acid, C₁₅H₂₁NO₄] (MOXA) (7. ábra).



7. ábra Az *S*-*metolachlor* fő bomlástermékei: *metolachlor* etánszulfonsav (MESA) és a *metolachlor* oxanilsav (MOXA)

Forrás: saját készítésű ábra LEFRANCQ 2014 munkája alapján.

A *metolachlor** és az *S*-*metolachlor* a különböző *in vivo* toxikológiában használatos emlős modellállatokon és sejtvonalakon kifejtett hatásokon túl egyéb káros hatásokat is gyakorol az élővilágra (metabolitjaival egyetemben – MESA, MOXA), melyekre ökotoxikológiai vizsgálatok eredményei alapján következtethetünk (3. táblázat). A szakirodalmi adatokat tekintve (3. táblázat) az *R*-*metolachlor**, *S*-*metolachlor* képesek egysejtű mikroalga fajok növekedését, klorofill tartalmát, sejtek struktúráját káros mértékben befolyásolni: a vizsgálatokban az *S*-*metolachlor* toxikusabbnak bizonyult (LIU & XIONG 2009). Egy másik mikroalga fajra is szignifikáns hatást gyakorolva megváltoztatta a sejtek celluláris antioxidáns védelmi képességét, hatására nőtt a reaktív oxigén gyökök képződése, csökkent a sejtek növekedési üteme és fotoszintetikus pigment koncentrációja (MARONIC *et al.* 2018). Az *S*-*metolachlor* szignifikáns termékenység csökkenést okozott vízibolha nőstény egyedeken (NEVES *et al.* 2015), metabolitokkal környezetileg releváns koncentrációkban (0,01, 0,1 és 1 µg/L) DNS károsodást, fejlődési rendellenességeket okozott osztrigán (GAMAIN *et al.* 2016, MAI *et al.* 2014), illetve édesvízi rák és hal fajokon káros hatásokat váltottak ki környezetileg releváns koncentrációkban (VELISEK *et al.* 2019, 2018; ROZMÁNKOVÁ *et al.* 2020), tehát kockázatot jelenthetnek a vízi élőlényekre. A 1272/2008/EK rendelet víz veszélyességi szempontból történő besorolási

rendszere az *S-metolachlor*-t a H400 (nagyon mérgező a vízi élővilágra) és a H410 (nagyon mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz) kategóriába sorolta.

3. táblázat: Az *R-metolachlor*, *S-metolachlor* és bomlástermékeik (MESA, MOXA) káros biológiai hatásai vízi, ökotoxikológiai tesztszervezeteken szakirodalmi adatok alapján.

Vegyület	Testszervezet	Expozíció és hatás	Koncentráció	Irodalmi hivatkozás
<i>S-metolachlor</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i> (baktérium)	15 perc EC ₅₀ biolumineszcencia gátlás	196,7 ± 28,5 mg/L	JOLY <i>et al.</i> (2013)
<i>R-metolachlor</i> *	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (alga)	24 óra 48 óra 72 óra 96 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	0,196 mg/L 0,241 mg/L 0,177 mg/L 0,152 mg/L	LIU & XIONG (2009)
<i>S-metolachlor</i>		24 óra 48 óra 72 óra 96 óra EC ₅₀ növekedés gátlás	0,116 mg/L 0,106 mg/L 0,081 mg/L 0,068 mg/L	
<i>S-metolachlor</i>	<i>Parachlorella kessleri</i> (alga)	72 óra EC ₅₀	1,09 mg/L	MARONIĆ <i>et al.</i> (2018)
<i>S-metolachlor</i>	<i>Daphnia longispina</i> (vízibolha)	21 nap EC ₅₀ termékenység csökkenés	8,24 mg/L	NEVES <i>et al.</i> (2015)
<i>S-metolachlor</i>	<i>Crassostrea gigas</i> (osztriga)	24 óra EC ₅₀ fejlődési rendellenességek DNS károsodás	0,01 µg/L	GAMAIN <i>et al.</i> (2016) MAI <i>et al.</i> (2014)
MESA			1 µg/L	
MOXA			0,1 µg/L	
<i>S-metolachlor</i>	<i>Procambarus virginalis</i> (rák)	45 nap magasabb mortalitás, késettletett ontogenetikai fejlődés, lassabb növekedés, izgalmi állapotú viselkedési zavarok	11 és 110 µg/L	VELISEK <i>et al.</i> (2019)
MOXA	<i>Procambarus virginalis</i> (rák)	45 nap szignifikánsan lassabb növekedés; szuperoxid dizmutáz, kataláz és glutation S-transzferáz enzim aktivitás csökkenés; szignifikánsan megkésett ontogenetikai fejlődés és lipid peroxidáció	4,2 µg/L; 42 µg/L; 420 µg/L	VELISEK <i>et al.</i> (2018)
<i>S-metolachlor</i> + MESA+MOXA keverék	<i>Danio rerio</i> (hal)	5 nap spontán farokmozgás csökkenése; gerinc deformáció; kraniofaciális deformáció, petezsák malabszorpció; pajzsmirigy rendszer zavarok	1 µg/L; 30 µg/L; 100 µg/L	ROZMÁNKOVÁ <i>et al.</i> (2020)

3.4.3 Metolachlor*/S-metolachlor környezeti előfordulása, sorsa, degradációja

A viszonylag magas vízoldhatóságának és a talajrészecskékhez való mérsékelt szorpciójának ($K_{oc} = 200 \text{ mL/g}$) köszönhetően könnyen elszivároghat a talajvízbe és a víztartó rétegekbe. Az S-metolachlor analitikai módszerekkel történő elválasztása az (R)-izomertől nagy kihívást jelent, ezért a környezeti kémiai-analitikában az „össz” metolachlor molekula koncentráció értékeinek a meghatározása a mérvadó (AMALRIC *et al.* 2013, BARAN & GOURCY 2013, BUSER *et al.* 2000, LOPEZ *et al.* 2015, RIVARD 2003, ZEMOLIN *et al.* 2014).

Hidrolizációs felezési ideje $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on több, mint 200 nap. A talajból való kimosódása függ a talaj szerves anyagaihoz való adszorpciójától, a talaj szerkezetétől, víztartalmától és a csapadék mennyiségétől. Félélet idejét talajban 47 és 107 nap közötti időintervallumra becsülik (WHO 1996). A metolachlor* egyik fő bomlási útvonala a talajban aerob és anaerob mikroorganizmusok által megy végbe. Metabolitjai (MESA és MOXA) (5. ábra) sokkal mobilisabbak és perzisztensebbek a környezetben. A transzformáció eredményeként az anyavegyület klór atomja a glutation által helyeződik át. A két bomlástermék képződése egymástól eltérő enzimatisz utvonalakon zajlik (RIVARD 2003, SIDOLI *et al.* 2016). Ennek eredményeként ezeket a degradátumokat gyakran nagyobb koncentrációban detektálják vízmintákban, mint magát az alapvegyületet (ELLIOTT & VANDERMEULEN 2017, HLADIK *et al.* 2005). Különböző országokban és környezeti mátrixokban való előfordulásukat/koncentrációjukat a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: Az metolachlor*, S-metolachlor és bomlástermékeik (MESA, MOXA) környezeti előfordulása.

Vegyület	Ország	Környezeti mátrix	Koncentráció	Irodalmi hivatkozás
metolachlor*	USA (észak-kelet)	felszíni víz (Ohio folyó)	5 $\mu\text{g/L}$ (átlag) 78 $\mu\text{g/L}$ (maximum)	BATTAGLIN <i>et al.</i> (2000)
S-metolachlor	USA	felszíni víz talajvíz	0,02 – 5,3 $\mu\text{g/L}$ 18,7 $\mu\text{g/L}$ (maximum)	TRASK <i>et al.</i> (2003)
metolachlor*, MESA, MOXA	USA (közép-nyugat)	talajvíz, felszín alatti vízbázisok	0,01 – 0,1 $\mu\text{g/L}$ (medián)	HLADIK <i>et al.</i> (2008)
metolachlor*	EU (23 ország)	felszíni víz	0,209 $\mu\text{g/L}$ (maximum) 0,002 $\mu\text{g/L}$ (átlag)	LOOS <i>et al.</i> (2010)
metolachlor*	Magyarország	talaj (leggyakoribb szennyező)	0,002 – 0,15 $\mu\text{g/L}$	MÖRTL és mtsai. (2010) SZÉKÁCS <i>et al.</i> (2015)
metolachlor*	Magyarország	felszíni- és felszín alatti víz (második leggyakoribb)	0,56 – 55,9 $\mu\text{g/L}$	MÖRTL és mtsai. (2010) SZÉKÁCS <i>et al.</i> (2015)
S-metolachlor	Franciaország	felszíni víz (Leyre folyó)	0,5 $\mu\text{g/L}$	ROUBEIX <i>et al.</i> (2012)
S-metolachlor	Csehország	felszíni víz	0,01 – 1,1 $\mu\text{g/L}$	VELISEK <i>et al.</i> (2019)

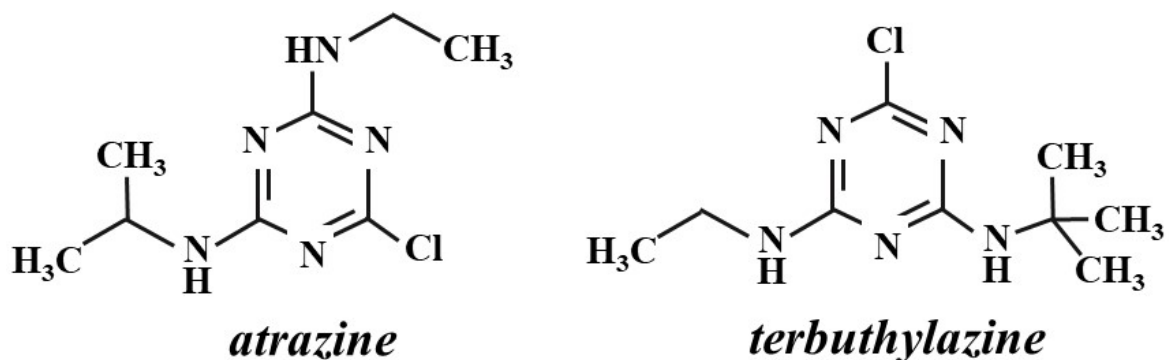
A *metolachlor** mikrobiológiai lebontásával számos szakirodalom foglalkozik. MARTINS és mtsai. (2007) mezőgazdasági talajokból izoláltak *metolachlor** biodegradációjára képes baktérium fajokat. A 30 napos biodegradációs kísérletekbe vont fajok közül három közepes bontási hatásfokkal *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* GC s. B1 törzs (39,9%), *Pseudomonas alcaligenes* (44,0%), *Enterobacter aerogenes* GC s. A törzs (45,8%) és egy *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* GC s. B2 törzse kiválónak mondható 99%-os hatásfokkal bontotta a herbicidet. A *Bacillus simplex* 30%-át 5 nap után, a *Candida xestobii* 60%-át 4 nap után bontotta el az 50 µg/mL végkoncentrációra beállított vegyületnek (MUNOZ *et al.* 2011), keverék kultúrákban *Bacillus luciferensis*, *Kocuria erythromyxa*, *Pseudomonas putida* és *Stenotrophomonas acidaminiphila* mikroorganizmusok együttes tevékenységének eredményeként, 21 napos inkubációt követően a *metolachlor** 6,7 mg/L koncentrációjának 39%-át degradálták (XU *et al.* 2008a).

3.5 *Terbuthylazine* bemutatása

3.5.1 *Terbuthylazine* hatóanyag jellemzése, hatásmechanizmusa, fizikai-kémiai paraméterei

Az *atrazine** (1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine, C₈H₁₄ClN₅) felhasználását a 90-es évekre szigorúan korlátozták, 2004-es EU-s (Magyarország 2007 óta) betiltása óta annak helyettesítésére Magyarországon és az EU országaiban a szintén szimmetrikus-triazinok csoportjába tartozó *terbuthylazine* (N-tert-butyl-6-chloro-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine2, C₉H₁₆ClN₅) pre- és posztemergens módon alkalmazható herbicid hatóanyag használatos. A szimmetrikus-triazinok közül jelenleg mindösszesen a *terbuthylazine* használata engedélyezett Magyarországon. Hatékonysága nem éri el a korábban alkalmazott *atrazine** hatóanyagét, melyet leggyakrabban pozitív szinergista hatások miatt használják együttesen - főként - *mesotrione*-nal és az *S-metolachlor*-ral, mely hatóanyagokkal lehetőség adódik az EU által engedélyezett maximális hektáronkénti *terbuthylazine* dózis (750 g/ha) kijuttatására a jobb gyommentesítési hatékonyság elérésének érdekében kukorica- és búzatáblák vegyszeres gyomirtásában (JABLONOWSKI *et al.* 2011, PETHŐ 2015, TÓTH-CSANTAVÉRI és mtsai. 2014).

Az *atrazine** és a *terbuthylazine* között szerkezeti képleteik alapján mindössze egy alkilcsoportban van eltérés, az izopropil csoport helyett az utóbbi vegyületben izobutil csoport kapcsolódik az aminocsoporthoz (8. ábra). Fizikai megjelenés alapján fehér kristályos vegyület. Vízben való oldhatósága alacsony, 6,6 mg/L 20 °C-on. Az oktanol-víz megoszlási hányadosa (log Pow) viszonylag nagy: pH 7 értéken és 20 °C-on 3,4, amely mérőszám a vegyület lipofil jellegét jellemzi (PESTICIDE PROPERTIES DATABASE 2020).



8. ábra: Az atrazine és a terbuthylazine szerkezeti képlete
Forrás: saját készítésű ábra a HHTP7 és HHTP8 hivatkozások alapján.

A *terbuthylazine* a II. fotoszintetikus rendszer (PSII) gátlásán keresztül fejti ki hatását, ezáltal minden magasabb szerveződési szinten álló fotoszintetizáló növényre és algára toxikus. Szisztémikus hatású, akropetálisan transzlokálódó hatóanyag. Specifikusan képes kötődni a fotoszintetikus rendszer D1 heterodimer protein heterológ D1 fehérjéhez, gátolva ezzel a víz fotólízisét, elfoglalva a plasztokinon kötőhelyét, szétválasztva az elektronszállító rendszert, ami végső soron azt eredményezi, hogy nem képződik NADPH és ATP, ami sejthalálhoz vezet. Magról kelő egy- és kétszikű gyomok ellen is hatásos (TREBST 2008).

Terbuthylazine összesen 11 db alapengedéllyel (Akris SE[®] [+*dimethenamid-P*], Aspect T[®] [+*flufenacet*], Basar Plus[®] [+*S-metolachlor*] Calaris[®] [+*mesotrione*], Calaris Pro[®] [+*mesotrione*], Click Combi[®] [+*dimethenamid-P*], Gardoprim Plus Gold[®] [+*S-metolachlor*], Lumax[®] [+*mesotrione*, +*S-metolachlor*], Lumax[®] H 537,5 SE [+*mesotrione*, +*S-metolachlor*], Successor TX[®] [+*pethoxamid*], Sulcotrek[®] [+*sulcotrione*], 4 párhuzamos engedéllyel (Gardo Gold[®] [+*S-metolachlor*], Gardoprim Plus Gold[®] [+*S-metolachlor*], Gardoprim Plus Gold[®] 500 SC [+*S-metolachlor*], Successor TX[®] [+*pethoxamid*]), 4 származtatott engedéllyel (Click Pro[®] [+*mesotrione*], Silba[®] [+*S-metolachlor*], Success T[®] [+*pethoxamid*], Terbyne Combi[®] [+*dimethenamid-P*]) rendelkező készítményben található meg jelenleg. A több, mint 15 éve forgalomban lévő *terbuthylazine* hatóanyagból >250 ezer kg kerül évente felhasználásra, melynek üteme folyamatosan emelkedik. Elsősorban kukorica gyomirtásában használják széles körben a világon (HHTP3, NÉBIH 2019).

3.5.2 Terbuthylazine toxicitása, káros biológiai hatásai

A *terbuthylazine* - szubkrónikus toxicitásának vizsgálata során – patkányon csökkent testsúlynövekedést, csecsemőmirigy-, vese-, májtömeg csökkenést eredményezett. A mérgezés nyulakon szintén csökkent testsúlynövekedés és táplálék-fogyasztás, nehézlégzés kialakulásával, szőrmeredezéssel, nyugodt, görbe testtartással, bőrirritációval jelentkezik. Krónikus toxicitás vizsgálata patkányokon és egereken csökkent súlygyarapodást és táplálék-fogyasztást okozott.

Fitotoxikus a vízinövényekre, enyhén toxikus vízi gerinctelenekre, mérsékelten toxikus hideg és meleg vízi halakra, erősen toxikus torkolati/tengeri gerinctelenekre akut expozíció során (US EPA 1995, EFSA 2011). Az Európai Bizottság 2011-ben megalkotta a hatóanyag referenciaértékeit: ADI 0,004 mg/ttkg nap, AOEL 0,0032 mg/ttkg nap és az ARfD értéke 0,008 mg/ttkg (EUROPEAN COMMISSION 2011, EFSA 2011; 2017b). A US EPA (2017) és az Európai Vegyianyag Ügynökség (ECHA) Kockázatkezelési Bizottságának értékelése alapján 2015-ben arra a következtetésre jutottak a döntéshozók, hogy a rákkeltő hatás szempontjából nem indokolt osztályozni a *terbuthylazine*-t (ECHA 2015, ŽELJEŽIĆ *et al.* 2018). Rákkeltő tulajdonságait tekintve 3. kategóriába sorolt – nem osztályozható a rákkeltő hatásokat nézve az emberre (EFSA 2016).

A fellelhető ökotoxikológiai irodalom a *terbuthylazine*-ről feltűnően csekély. Néhány publikáció számol be csupán arról, hogy a *terbuthylazine* (készítményben, más peszticiddel kombinálva szinergista hatást elérve) káros hatással lehet a halak (*Cyprinus carpio*, *Danio rerio*) növekedésére, fejlődésére, viselkedésére és az oxidatív stressz biomarkereire környezetileg nem releváns koncentrációkban (520 µg/L – 3,3 mg/L) (MIKULIKOVA *et al.* 2013, PÉREZ *et al.* 2012, ŠTĚPÁNOVÁ *et al.* 2012, ŽIVKOVIĆ SEMREN *et al.* 2018). Genotoxicitásának megállapítása szempontjából ŽELJEŽIĆ és mtsai. (2018) humán limfocitákon és HepG2 sejteken tesztelte a vegyületet. Kísérleteikben a legmagasabb tesztelt koncentráció (8 ng/mL) 15% -kal csökkentette a limfociták életképességét, főként az apoptózis jelensége miatt, míg a HepG2 sejtekben ugyanazon koncentrációban a citotoxikus hatások elhanyagolhatóak voltak. Az akut humán limfociták és HepG2 sejtek *in vitro* expozíciója kis aktivitású DNS instabilitást eredményezett. A *terbuthylazine* genotoxicitása mögött elsősorban nem az oxidatív stressz jelenségek álltak (ŽELJEŽIĆ *et al.* 2018). Erdei békák (*Rana dalmatina*) esetében 0,3 µg/L *terbuthylazine*-nal végzett kezelés csökkentette az ebihalak aktivitását és csökkentette a juvenilisek zsírtömegét. A barna varangyoknál (*Bufo bufo*) a 0,003 µg/L kezelés megnövelte a testtömegüket, a 0,3 µg/L-rel végzett kezelés megnövelte az optikai *tecta* méretét (BÓKONY *et al.* 2020).

Magyarországon különösen aggályos a *terbuthylazine*, mint egyetlen, hazánkban jelenleg forgalomban lévő szimmetrikus-triazin típusú gyomirtó, amelynek bomlása az *atrazine**-hoz hasonló biológiai hatással rendelkező vegyületet eredményez (HALÁSZ és mtsai. 2013). Hormonháztartást zavaró hatását JEG-3 humán sejtvonalon koncentráció-függő módon, 0,0002-22,97 mg/L koncentráció tartományban váltotta ki, gyenge aromatáz induktor hatást mutatva (KJELDSEN *et al.* 2013). Szerkezeti hasonlóságukból fakadóan a *terbuthylazine* bomlása az *atrazine**-nal megegyező (deizopropil-*atrazine* - DIA) hormonrendszer zavaró vegyületet is eredményez (JIN *et al.* 2014). H295R humán koriokarcinóma sejtvonalon TAXVIG és mtsai.

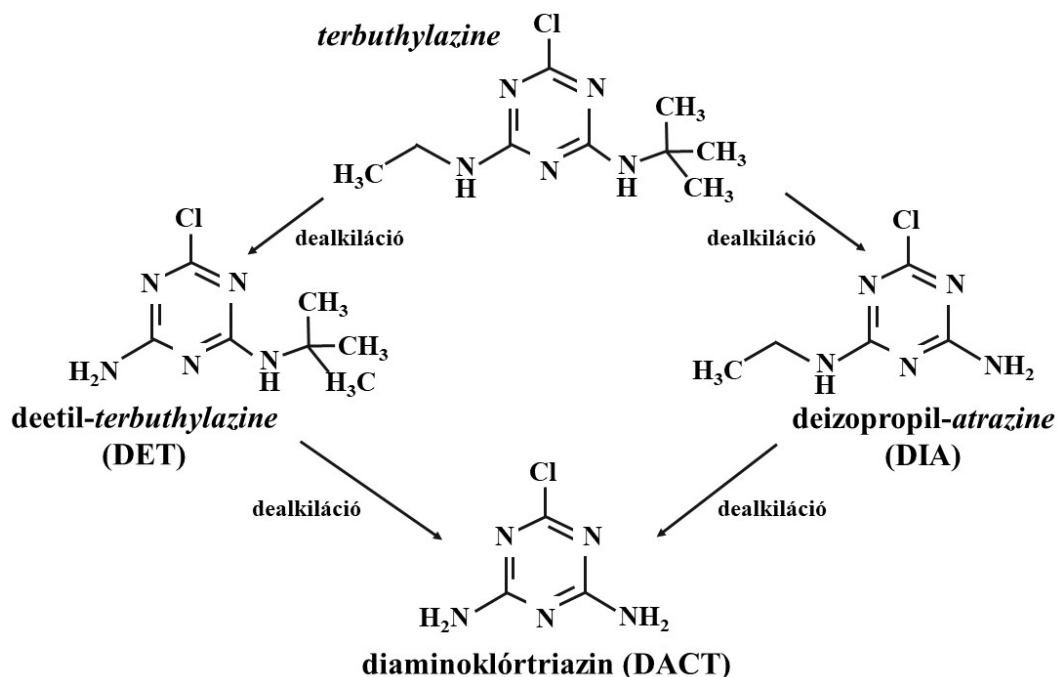
(2013) szerint a *terbuthylazine* 0,0014 mg/L-es LOEC értékkel jelentős hatást gyakorolt a progeszteron termelés növekedésére, valamint a tesztoszteron produkciót is indukálta (LOEC= 0,003 mg/L). Az ösztadiol termelésért felelős folyamatot is megzavarta, a hormon szintjét megnövelte 0,0007 mg/L koncentrációnál, feltételezhetően aromataz enzim induktor, ED hatást gyakorolt a sejtvonalon. A szerzők egyik hipotézise az volt a detektált, emelkedett nemihormon szintek kapcsán, hogy a *terbuthylazine* növeli az aromataz enzim aktivitását. Ez az enzim felelős az androsztendion és a tesztoszteron ösztronná és ösztadiollá történő átalakulásáért. Az aromataz enzim indukció és aktivitás növekedésének eredménye az emelkedett ösztrogénszint. Tehát a *terbuthylazine* indirekt szteroidszintézist megzavaró vegyület.

3.5.3 *Terbuthylazine* környezeti előfordulása, sorsa, degradációja

A *terbuthylazine* a környezetben az egyik legerzisztensebb vegyület a szimmetrikus triazinok között. Legfőbb degradációs útja a mikrobiológiai lebomlás, DT₅₀ idejét talajban igen tág határok közé teszik, a fizikai talajféleségtől és hőmérséklettől függően 5-331 nap (CARAFA *et al.* 2007, NAVARRO *et al.* 2004). Közel azonos kimosódási képességgel (GUS index: 2,19) rendelkezik a talajban, mint az *atrazine** (GUS index: 2,57) (PESTICIDE PROPERTIES DATABASE 2020). Tengervizekben 76 nap a DT₅₀ értéke, folyóvizekben 196 nap, talajvizekben 366 nap (GRENNI *et al.* 2012, NAVARRO *et al.* 2004). Relatív hosszú felezési ideje miatt redukív körülmények között, oxigén hiányában a *terbuthylazine* az EU számos országában (Olaszország, Spanyolország, Németország) a 98/83/EK ivóvíz-irányelv által megállapított maximális megengedhető 0,1 µg/L határérték feletti koncentrációban, ritkán 2 µg/L feletti koncentrációban található meg felszíni- és felszín alatti vizekben. Ezek a koncentráció értékek nagyobb mértékben (2,46 – 3,43 µg/L) is előfordulhatnak mezőgazdasági művelés alatt álló területek földtani közegeiben, felszíni- és felszín alatti vizeiben. Heves esőzések után a herbicidek akár két nagyságrenddel magasabb koncentrációban (300 µg/L) is kimutathatók a lefolyó csurgalékvizekben (CARDINALI *et al.* 2013, OTTO *et al.* 2016). Az olasz folyókban az egyik leggyakrabban kimutatható peszticid a *terbuthylazine* (SBRILLI *et al.* 2005, DI GUARDO *et al.* 2020), egyre kiemelkedőbb szennyező a Po folyóban, ennek következtében pedig az Észak-Adriai-tengerben is dealkilezett bomlástermékével együtt (BOLDRIN *et al.* 2005, CARAFA *et al.* 2007, TOULOUPAKIS *et al.* 2005). Az Észak-Adriai-tengerben a *terbuthylazine* a leggyakrabban detektált peszticid, maximum koncentrációja 234,5 ng/L (CARAFA *et al.* 2007). Az anyavegyület és metabolitjai jelenleg is számottevő mennyiségben (0,01 – 1,27 µg/L) jelen vannak és perzisztálnak a talajvízben (BOTTONI *et al.* 2013, GRENNI *et al.* 2012, GUZZELLA *et al.* 2006, HILDEBRANDT *et al.* 2008, STIPIČEVIĆ *et al.* 2015).

Az *atrazine** hatóanyag 2007. évi magyarországi visszavonását megelőzően, az NTKSZ-MGSZH-NÉBIH 2002-2010 közötti felmérése szerint Magyarországon a felszíni vízmintákból detektált leggyakoribb komponens az *atrazine** volt, ezen a listán a *terbuthylazine* a 13. helyet foglalta el. Felfutó hatóanyagként, a 2015. január 1. állapotot tükröző jelentés szerint a folyamatos vízi monitorozásra jelölt növényvédő szer hatóanyagok közé sorolták (DARVAS & SZÉKÁCS 2006, PETHŐ 2015).

A *terbuthylazine* fő metabolikus bomlása N-dealkilezésen (alkil vagy aril csoport hasad le a molekuláról) keresztül deetil-*terbuthylazine* (DET) vagy detercbutil-*terbuthylazine* (DTT) képződik, amely során a terc-butil (CH₃)₃C csoport egy metil (CH₃) csoportjának oxidációja következik be, amit az alkohol glükoronsavas konjugációja követ. A molekula hidroxiterbuthylazine (TERB-OH) metabolitja a deklórozás folyamatával jön létre. A hidroxidealkilezett metabolitok, a hidroxidezetil-*terbuthylazine* (DET-OH) és a hidroxidetercbutil-*terbuthylazine* (DTT-OH) tovább képződhetnek DET vagy DTT deklórozásával vagy a TERB-OH dealkilálásával. A hidroxiterbuthylazine abiotikus és biotikus körülmények között is képződhet, míg a deetil-*terbuthylazine* csak biotikus körülmények között. Míg az első lebontási út dealkilezett klór-metabolitok képződését eredményezi, a második az s-triazin-gyűrű klór-, amino- és alkil-amino-szubsztituenseinek hidrolitikus hasítási reakcióit eredményezi, amelyek cianursavvá alakulnak át. Az s-triazin-gyűrű lebontásában részt vevő enzimeket és az azokat kódoló géneket már azonosították. A *trzN/atzA*, *atzB* és *atzC* gének három hidroláz enzimet kódolnak, amelyek katalizálják az s-triazinok cianursavvá történő lebontását. A cianursav képződése közbenső termékként, egy további hidrolitikus gyűrű hasítás folyamatán (*TrzD/AtzD*, *AtzE* és *AtzF* enzimek segítségével) átesve biuret, CO₂ és NH₃ keletkezik (SHAPIR *et al.* 2007, GETENGA *et al.* 2009, GRENNI 2011). Az *atrazine* és a *terbuthylazine* molekulák csak egy alkil-oldalláncban különböznek, azok az enzimek, amelyek felelősek az oldallánc eltávolításáért, könnyebben képesek eltávolítani az izopropil csoportot az *atrazine*-ből, mint a terc-butil csoportot a *terbuthylazine*-ből. Bomlása során az *atrazine* bomlástermékeivel azonos degradációs termékek is képződhetnek [deizopropil-*atrazine* (DIA), diaminoklórtriazin (DACT)] (9. ábra) (CARACCILOLO *et al.* 2010, CARACCILOLO *et al.* 2005, GRENNI 2011, JURINA *et al.* 2014, MERCADANTE *et al.* 2013). A bomlástermékek képződése az adott mikrobaközösség diverzitásától, képviselőinek degradációs képességétől, hatékonyságától és egyéb abiotikus tényezőktől függ.



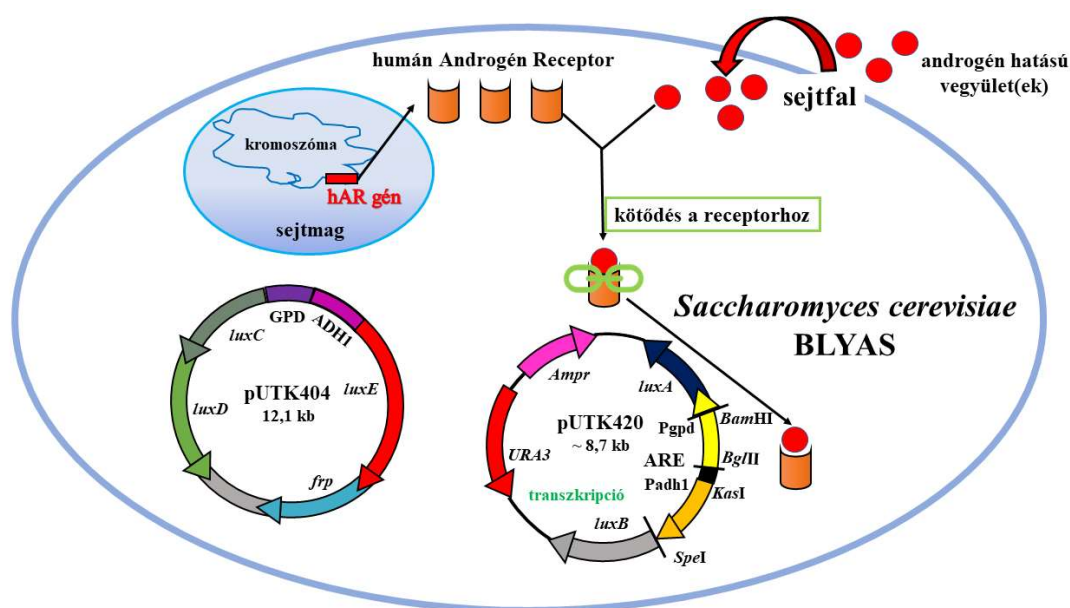
9. ábra: A *terbutylazine* lehetséges degradációs útvonalai
 Forrás: saját készítésű ábra MERCADANTE *et al.* 2013 munkája alapján.

Közvetlenül a *terbutylazine* biodegradációjára képes mikroorganizmusokról/mikroba kultúrákról kevés ismeret áll rendelkezésre a szakirodalomban. Folyékony tenyészetben egy *Arthrobacter* sp. GZK-1 jelű törzse a 8 mg/L kiindulási koncentrációjának a 65%-át 14 nap alatt használta fel nitrogén forrásként (GETENGA *et al.* 2009). 100 µg/L koncentrációjú *terbutylazine*-nal szennyezett talajvízből izolált *Advenella incenata*-ról és *Janthinobacterium lividum*-ról igazolták, hogy a degradáció mértéke az utóbbi esetben DT₅₀ érték alapján 121±10 nap, az előbbi esetében 88±6 nap. A biodegradációért felelős *atzA*, *atzB* és *atzC* géneket is azonosították a mikrobákban (CARACCILO *et al.* 2010). GRENNI és mtsai. (2009) víztározóból azonosított egy *Rhodococcus wratislaviensis* FPA1 baktériumtörzset, mely egyedüli szénforrásként mineralizálja a vegyület 100 µg/L koncentrációjának 50%-át 62 nap alatt. Horvát kutatók sikeresen tenyésztésbe vonva és fenntartva az M3-T nevű kevert mikrobakonzorciumot megállapították, hogy a kultúra képviselői (*Arthrobacter* sp., *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas* sp.) az 50 mg/L *terbutylazine* 90%-át 2 hét leforgása alatt képesek eltávolítani (JURINA *et al.* 2014). Polivinil-alkohol nátrium alginát mikrogyöngyökön immobilizált *Leucobacter* sp. JW-1 nagyobb hatásfokkal (95,2%) távolította el a *terbutylazine*-t (50 mg/L) 2 nap alatt, mint a szabad sejtes kísérletben (LIU *et al.* 2018). Egy friss kutatás szerint a *Pseudomonas stutzeri* Y2 törzse 4 nap alatt távolította el ásványi só tápoldatból a vegyület 50 mg/L koncentrációjának a 100%-át (ZHANG *et al.* 2020).

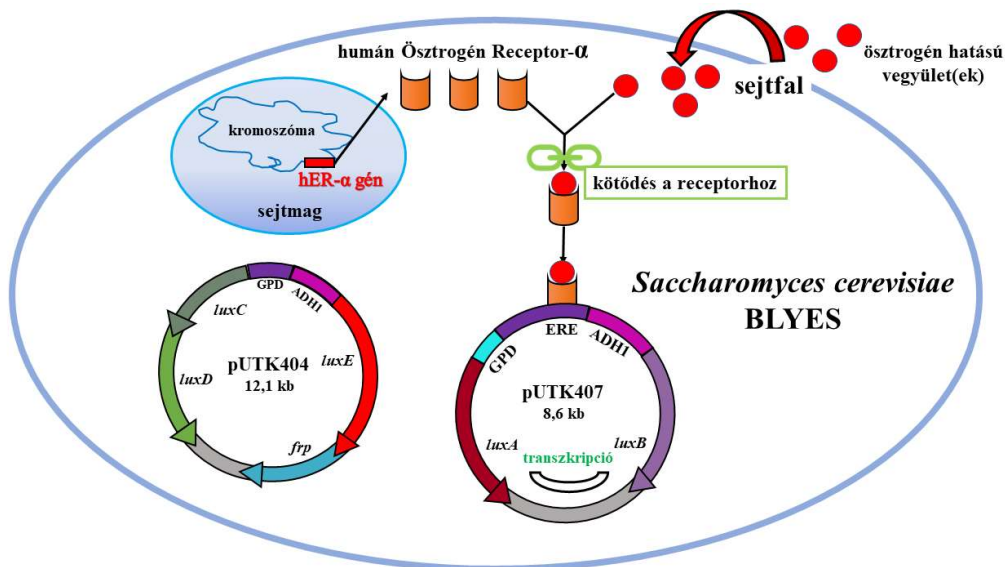
3.6 Bioripporter tesztrendszerek az ökotoxikológiában

A bioszenzorok az emberi eredetű környezet szennyező anyagok, toxinok és általánosságban véve az emberi egészségre potenciális veszélyt jelentő kémiai markerek felderítésének és figyelemmel kísérésének hatékony eszközei. A teljes sejtes bioszenzorok állati szöveteken, baktériumokon, vagy eukarióta mikroorganizmusokon, például élesztőkön alapulnak. Az élesztőgombák élelmiszeripari jelentőségük mellett a káros környezeti feltételekre rendkívüli mértékben ellenálló eukariótákként kiváló sejtmodellek is. Ezen okokból, valamint a tenyésztetőségük egyszerűségével és a könnyű genetikai módosíthatóságukkal együtt, az élesztőket az 1970-es évek óta gyakran használják bioszenzorok biológiai elemeiként (MARTIN-YKEN 2020).

A géntechnológiával módosított *S. cerevisiae* törzsek kromoszómáisan egy hormon-specifikus sejtmagi receptort expresszálnak, amely az ED vegyület(ek) expozíciójának hatására bekapcsolja a riporter operon epizomális expresszióját hormon-specifikus promoter szabályozása alatt. A genomba intergált humán androgén (hAR) és ösztrogén receptor- α (hER- α) géneket, valamint a megfelelő hormonválasz elemek mellett lux géneket (*Photorhabdus luminescens* luciferáz gén kazettája – luxCDABE) tartalmazó plazmidokat tartalmazó BLYAS (pUTK404, pUTK420) és BLYES (pUTK 404, pUTK 407) törzsekkel a vizsgálni kívánt anyagok a hAR és a hER- α receptorokhoz való közvetlen kötődési képessége vizsgálható, autonóm biolumineszcencia változás (intenzifikáció) koncentráció-függő módon történő detektálásával (10. és 11. ábra).

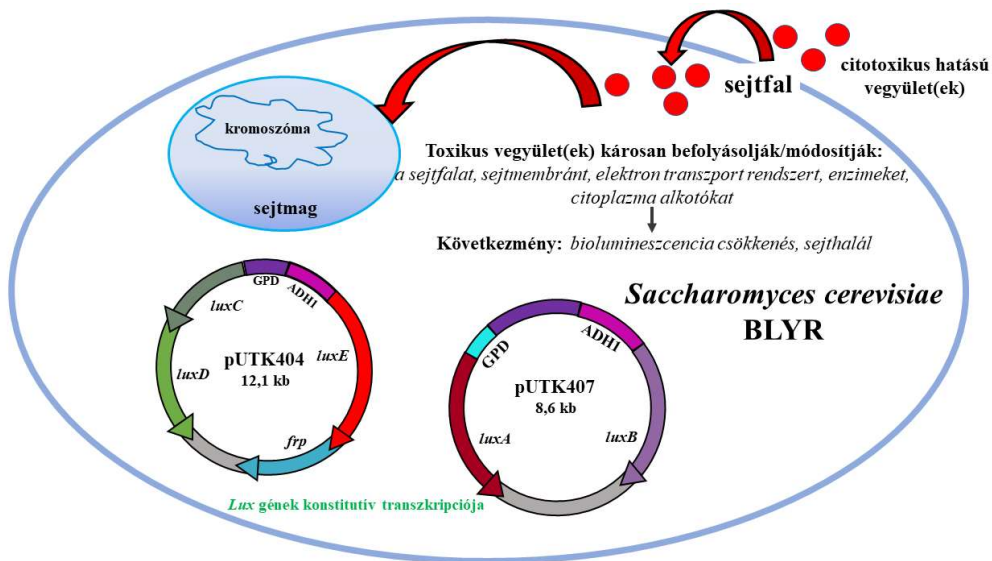


10. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS törzs működésének sematikus ábrája.
Forrás: saját készítésű ábra ELDRIDGE *et al.* (2007) munkája alapján.



11. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzs működésének sematikus ábrája.
 Forrás: saját készítésű ábra SANSEVERINO *et al.* (2005) munkája alapján.

A BLYAS és BLYES testszervezetek esetében a biolumineszcencia intenzitása egyenesen arányos a vegyület hormonális aktivitásának mértékével. A plazmidokon csak konstitutívan kifejeződő lux géneket hordozó BLYR törzs citotoxikus hatások mérésére alkalmazható (12. ábra), párhuzamosan a BLYAS/BLYES törzsekkel. Toxikus vegyület(ek) károsan befolyásolják/módosítják a sejtfalat, sejtmembránt, elektron transzport rendszert, enzimeket, citoplazma alkotókat, melynek következményeként sejthalál és/vagy fénykibocsátás csökkenés lép fel, amely biolumineszcencia gátlás mérésével válik detektálhatóvá. A tesztek mikrotiter lemezekon való összeállításával több minta, egyidejű, nagy teljesítményű, költséghatékony elemzése válik lehetővé (ELDRIDGE *et al.* 2007; SANSEVERINO *et al.* 2005, 2009; XU *et al.* 2020).



12. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYR törzs működésének sematikus ábrája.
 Forrás: saját készítésű ábra ELDRIDGE *et al.* (2007) munkája alapján.

3.7 A herbicid keverékek együttes, biológiai/ökotoxikológiai hatásai

Az első generációs növényvédő szer hatóanyagokkal szembeni ellenőrzés hiánya magával hozta ezek újraértékelési és helyettesítési folyamatait. Annak érdekében, hogy csökkentsék a peszticidek felhasználását és ezzel járó környezet- és humánegészségügyi kockázatokat, „kevésbé veszélyes” molekulák új generációja jelent meg, hatékonyságuk biztosítása miatt, kombinációkban, úgynevezett peszticid „koktélokban”, kisebb arányban kijuttatva a haszonnövény kultúrákban (JOLY *et al.* 2012).

A környezetben a szennyezőanyagok egyik fő csoportjaként megjelenő peszticidek ökoszisztémára gyakorolt káros hatásai sokszor csak hosszú távú alkalmazásuk után jelennek meg, amelyekre a múlt század közepe óta intenzív kutatások révén a nyilvánosság figyelme irányul. A toxicitási mechanizmusok eltérőek lehetnek az akut és krónikus toxicitás között. Rövid expozíciós időnél a vegyületek akut toxicitását leginkább befolyásoló tényezők a vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai, amellyel befolyásolják a sejtmembrán integritását, mely által az elveszti *barrier* funkcióját. A rövid expozíciós idejű tesztek eredményei alapján meglehetősen bonyolult és tévesen becsülhetőek meg a várható krónikus hatások. A környezeti kockázatértékeléssel kapcsolatos fontos feladatok egyike az új, nemzetközileg elfogadott krónikus ökotoxikológiai tesztek kidolgozása, amely támogathatja az újonnan megjelenő vegyi anyagok pontosabb kockázatértékelését. Az utóbbi években egyre intenzívebb kutatási téma az egyes toxikológiai/ ökotoxikológiai vizsgálatok miniatürizálása. Az elmúlt két évtizedben számos új biológiai/toxikológiai vizsgálat szabványosított változatát miniatürizálták és fejlesztették ki. A mikroméretű toxicitási módszerek nagy mintafeldolgozó képességgel, alacsonyabb költségekkel rendelkeznek és így egyre vonzóbb eszközei a rutin vizsgálatoknak. A tesztek módszerfejlesztése inkubációs- és kontaktidejükre is irányuló folyamat (HIRMANN *et al.* 2007, KOUTNY & ZAORALKOVA 2005, MORKUS *et al.* 2019, PERSOONE *et al.* 2000, SANSEVERINO *et al.* 2005, WANG *et al.* 2016). Hosszú távon a szennyezőanyagok egymás, illetve a környezetben található vegyületek közötti interakciók következtében additív, antagonistá vagy szinergista, folyamatok léphetnek fel, melyek ökoszisztémákra gyakorolt káros hatásainak felmérésére a biológiai/ökotoxikológiai módszerek alkalmasak (FAUST *et al.* 1994, FERNÁNDEZ-ALBA *et al.* 2002, HERNANDO *et al.* 2003).

A peszticidek együttes hatásainak legnagyobb adatbázisát BELDEN és mtsai. (2007) alkotta meg, melyben 207 növényvédő szer keverékről szolgáltatnak adatokat, amelyek közül 194 bináris, és további 13 több, mint két peszticidből áll. Az általam vizsgált *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* ugyan megtalálható az adatbázisban, viszont ezen herbicidek egymással alkotott keverékeiről nem állnak rendelkezésre adatok, ugyanakkor Magyarországon ezeket a hatóanyagokat többnyire egymással kombinálva alkalmazzák a forgalomban lévő

készítményekben. Bár CEDERGREEN (2014) munkája betekintést nyújt a környezetben megjelenő vegyi anyag keverékek potenciális koktél- és szinergikus kölcsönhatásairól, gyakori használatuk ellenére a nemzetközi tanulmányokból továbbra is hiányoznak a hatóanyag mixtúrákkal, formázott peszticidekkel és a formázószerekkel kapcsolatos eredmények. Mivel ezeket a vegyületeket úgy tervezték meg, hogy befolyásolják a célszervezetek biológiáját, nem meglepő, hogy ezek az együttes, nem prediktálható (öko)toxikus hatások felléphetnek a nem-célszervezetekben, letális és szubletális hatások (pl. az élőszervezetek fiziológiájában, fejlődésében, viselkedésében és a reprodukciójában okozva zavarokat, elváltozásokat) mellett.

A rendelkezésre álló szakirodalom hiányos a *mesotrione*, *S-metolachlor* és *terbuthylazine* kombinált biológiai/toxikológiai/ökotoxikológiai hatásai feltárása szempontjából. Csupán csak néhány tanulmány vizsgálta a *mesotrione*, az *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* akut mikrobiológiai toxicitását önmagukban és egy-két esetben kombinációkban, *Aliivibrio fischeri* standardizált Microtox[®] teszt alkalmazásával (BONNET *et al.* 2008, CARLES *et al.* 2018, JOLY *et al.* 2013, KÖCK *et al.* 2010, VILLA *et al.* 2012). Ezen tanulmányok eredményeit az **Eredmények** és a **Következtetések, javaslatok fejezetekben** fogom taglalni a továbbiakban.

JOLY és mtsai. (2012) tanulmányának eredményei világosan rámutattak a talajok mikrobiális aktivitását befolyásoló tényezőkre, hogy mikor önmagában alkalmazzák a Callisto[®] (*mesotrione*, 100 g/L) és a Dual Gold[®] (*S-metolachlor*, 915 g/L) formázószereket is tartalmazó gyomirtó készítményeket az ajánlott terepi dózisokban, csekély hatások mutatkoznak meg a talajok mikrobiális közösségein 93 napos kezelést követően. Azonban megerősítették, hogy az ilyen herbicidek „koktélja” már 1×FR-nél (felhasználási területre vonatkozóan ajánlott mértékben/dózisban) alkalmazva hatással van a mikrobiális közösségek szerkezetére, ezek a hatások 10×FR értéknél felerősödtek. BOROWIK és mtsai. (2017) tudományos munkája a Lumax[®] 537,5 SE készítmény (37,5 g/L *mesotrione*; 375 g/L *S-metolachlor*; 125 g/L *terbuthylazine*) homokos talajok mikroorganizmus közösségire gyakorolt hatását (mikrobák száma, aktivitása) fejté ki. Az eredményeik azt mutatták, hogy a fenti hatóanyagok keveréke változásokat okozott az organotróf baktériumok, aktinomicéták és gombák kolóniafejlődési mutatóinak és a gombák ökofiziológiai sokféleségét leíró mutatók értékében. Az organotróf baktériumok és aktinomicéták ökofiziológiai diverzitási mutatójának változásai csekélyek voltak. A keverék erőteljesen gátolta a dehidrogenáz, kisebb mértékben kataláz, ureáz, β-glükozidáz és arilszulfatáz enzimeket, míg gyengén gátolta a foszfatázokat. A ténylegesen kifejtett hatás összefüggésben volt a termék adagolásával, ha a gyártó utasításainak megfelelően juttatták ki a herbicidet, nem okozott komoly zavart a talaj homeosztázisában. Az eltúlzott mennyiségek azonban (13,44 - 430,14 mg/kg/sz.a.) károsnak bizonyultak a talaj biótára (BOROWIK *et al.* 2017).

A *terbuthylazine*-t az *S-metolachlor*-ral készítményben kombinálva (Gardoprim Plus Gold® 500 SC – 187,5 g/L *terbuthylazine* + 312,5 g/L *S-metolachlor*) megállapították, hogy hatással van a ponty (*Cyprinus carpio*) biokémiai és hematológiai profiljára, valamint kóros, hisztopatológias léziókat figyeltek meg a halak kopolyájában és májában 13 mg/L-es (2,25 mg/L *terbuthylazine* és 3,75 mg/L *S-metolachlor*) kezelési koncentrációnál (DOBŠÍKOVÁ *et al.* 2011). Az *S-metolachlor*-t (312,5 g/L) és *terbuthylazine*-t (187,5 g/L) tartalmazó készítmény (Primextra® Gold TZ) kétszer nagyobb toxicitással rendelkezett vízibolha (*Daphnia longispina*) multigenerációs, hosszútávú életparamétereire, mint maga az *S-metolachlor* hatóanyag (NEVES *et al.* 2015). Ugyanezen peszticid termék rendkívül toxikus volt az torkolatvízi, evezőlábú rákra (*Acartia tonsa*) ($EC_{50} = 0,925$ mg/L) és a *Thalassiosira weissflogii* ($EC_{50} = 0,0078$ mg/L) kovamoszatra (FILIMONOVA *et al.* 2016).

Fontos megismernünk a peszticidek egyedi, káros hatásait önmagukban alkalmazva, azonban szükséges tanulmányozni/felmérni a mezőgazdasági területeken használt növényvédő szer koktélok/keverékek valós hatásait. Az eredmények vitathatatlanul bizonyítják, hogy a vizsgált herbicidek szigorúan a helyes mezőgazdasági gyakorlati alkalmazásnak megfelelő dózisokban is ártalmatlanok a szárazföldi és vízi ökoszisztémákra.

3.8 Szennyezett területekről izolált mikroorganizmusok biodegradációs és adaptációs potenciálja

A mikroorganizmusokon alapuló bioremediáció olyan ígéretes remediációs technikák közé tartozik, amely során *in situ* módon, mikrobiális közösségekből izolált, specifikus katabolikus potenciállal rendelkező, a célszennyeződések lebontására képes mikrobákat kármentesítési céllal használnak fel (CHEN *et al.* 2012, DASH *et al.* 2013, LIU *et al.* 2014a, RAMOS *et al.* 2011, SINGH *et al.* 2012). A hagyományos remediációs stratégiákhoz képest permanens, költséghatékonyabb és nem invazív a természetes ökoszisztémák számára (FUENTES *et al.* 2014, MEGHARAJ *et al.* 2011). Ezért a kémiai szennyezők környezeti szempontból releváns koncentrációkban zajló biológiai lebonthatóságának vizsgálata mind az alkalmazott ipari, mind az alapvető kutatási szférában szereplők között jelentős érdeklődést vált ki (ARORA *et al.* 2012, CHEN *et al.* 2014, CYCON *et al.* 2014, SINGH 2009, XIAO *et al.* 2015). A kutatási eredmények eddig bizonyították, hogy különféle mikroorganizmus fajok képesek átalakítani/lebontani a herbicideket ártalmatlan szerves vegyületekké (ERMAKOVA *et al.* 2010, SANDOVAL-CARRASCO *et al.* 2013). Ennek a technikának az alkalmazása azonban továbbra is korlátozott, mivel számos abiotikus/biotikus tényező könnyen gátolhatja/visszavetheti a katabolikus folyamatok lezajlását, ideértve a mikroszervezetek aktivitását és a megváltozó/megváltozott környezeti körülményeket (PERELO 2010).

A környezeti feltételek állandó változása mellett jelenlévő mikroorganizmusok jobban alkalmazkodnak a kedvezőtlen körülményekhez, így komplex-karakterisztikus adaptációs tulajdonságokat birtokolnak. Nagyon gyorsan reagálnak és válaszolnak a változó környezeti mintázatokra, ami ideálissá teszi őket potenciális bioremediációs és bioindikátor célokra. Szennyezett körülményeknek kitett mikroorganizmusok genetikai változásokkal adaptálódnak (növekedési rátájuk, a gén expressziójuk, a fiziológiai, vagy enzimatikus tevékenységeik révén, valamint a más szervezetekkel való mélyreható, szimbiotikus társulások megváltoztatásával alkalmazkodnak) a helyzethez, melyek eltolódásokat okoznak a bakteriális közösség(ek) összetételében. Az alkalmazott mikrobák túlélésének és aktivitásának javítása érdekében immobilizációs módszerek használata javasolt, amely fontos szerepet játszik a hosszú távú stabilizációjukban, ezáltal sikeresen alkalmazhatók a kármentesítési eljárásokban (LIU *et al.* 2015, PICCIRILLO *et al.* 2013, SINGH *et al.* 2006, STELTING *et al.* 2012, XU & LU 2010).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Doktori munkám során elvégzett mintavételeket, vizsgálatokat, tesztek és az alkalmazott anyagokat e fejezet alfejezetiben mutatom be. A könnyebb áttekintés és érthetőség érdekében a gyakorlati alapokon nyugvó munkámról készítettem egy sematikus folyamatábrát (M2. melléklet).

4.1 A növényvédő szerek és keverékeik, illetve a biodegradációs maradékanyagok biológiai hatáselemzésére alkalmazott ökotoxikológiai tesztek

4.1.1 A vizsgált vegyületek és az azokból készített törzsoldatok

A vizsgálataimhoz a növényvédő szer hatóanyagokat és egy metabolitot a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztem be (*mesotrione* Pestanal[®] analitikai standard, kémiai képlete: C₁₄H₁₃NO₇S, CAS szám: 104206-82-8, tisztaság: 99,9%; *S-metolachlor* Pestanal[®] analitikai standard, kémiai képlete: C₁₅H₂₂ClNO₂, CAS szám: 87392-12-9, tisztaság: 98,4%; *terbuthylazine* Pestanal[®] analitikai standard, kémiai képlete: C₉H₁₆ClN₅, CAS szám: 5915-41-3, tisztaság: 99,4%; *glyphosate* Pestanal[®] analitikai standard, kémiai képlete: C₃H₈NO₅P, CAS szám: 1071-83-6, tisztaság: ≥ 98 %; és a *glyphosate* fő metabolitja, az **AMPA**, analitikai standard, kémiai képlete: CH₆NO₃P, CAS szám: 1066-51-9, tisztaság: 99,9%). A polietoxilált faggyúamint, az átlagosan 15 etilénoxiddal (30 szénatom) rendelkező POEA-t³, [**POE(15)**]⁴, kémiai képlete: R-N(CH₂CH₂O)_m-H (CH₂CH₂O)_n-H, CAS szám: 61791-26-2, tisztaság: 100%) a Greyhound Chromatography and Allied Chemicals-től (UK, Wallasey, Birkenhead CH41 1LT) vásároltam meg.

A tiszta hatóanyagokat és azok keverékeit dimetil-szulfoxidban (**DMSO**, Fisher Scientific – Fisher Chemical, CAS szám: 67-68-5, tisztaság: ≥99,99%) oldottam fel és törzsoldatokat készítettem a *terbuthylazine*-ből 10 mg/mL koncentrációban, *S-metolachlor*-ból és a *mesotrione*-ből 25 mg/mL koncentrációban.

Az 1:1 és 1:1:1 arányú keverékek készítéséhez a tiszta hatóanyagokból azonos koncentrációjú (25 mg/mL) törzsoldatokat készítettem, melyeket azonos arányban kevertem egymással. Továbbá, a Syngenta AG Magyarország által gyártott *mesotrione*-t, *S-metolachlor*-t, *terbuthylazine*-t tartalmazó készítmények aktív hatóanyagainak arányai alapján is készítettem keverékeket: a Gardoprim Plus Gold[®] készítmény tartalma alapján (187 g/L *terbuthylazine*; 312 g/L *S-metolachlor*; [1:1,7 arány]), a Camix[®] készítmény tartalma alapján (60 g/L *mesotrione*; 500 g/L *S-metolachlor*; [1:8,5 arány]), a Calaris Pro[®] készítmény tartalma alapján (50 g/L

³ Első generációs polietoxilált amin (POEA típusú formázó szerek családja).

⁴ Átlagosan 15 etilénoxid csoport van egy tenzid molekulán, ami az etoxilálási fokot jelzi.

mesotrione; 326 g/L *terbuthylazine*; [1:6,5 arány]) és a Lumax[®] készítmény tartalma alapján (37,5 g/L *mesotrione*; 375 g/L *S-metolachlor*; 125 g/L *terbuthylazine*; [1:10:3 arány]).

A *glyphosate*-ot és az AMPA-t szilárd formájukban steril desztillált vízben oldottam fel és 10 mg/mL-es törzsoldatokat készítettem. A folyékony halmazállapotú POE(15)-t steril, desztillált vízzel hígítottam, amíg 1 mg/mL-es koncentrációjú oldatot kaptam.

A vizsgált *glyphosate*-alapú herbicid készítmények (**5. táblázat**) a magyarországi kereskedelemben szabadon hozzáférhetőek és beszerezhetőek bárki számára, ezeket a Praktika Kft. (2700 Cegléd, Rákóczi utca 43.) bocsájtotta rendelkezésemre: Barclay Gallup Biograde 360[®] (Barclay Chemicals (R&D) Ltd., 04.2/5211-1/2015, Magyarország); Boom Efekt[®] (Pinus TKI, 02.5/1146/1/2008, Magyarország); Dominator Extra 608 SL[®] (Albaugh UK Ltd., 04./4156-1/2012, Magyarország); Fozát 480[®] (Agro-Chemie Kft., 02.5/11609-1/2010, Magyarország), Gladiátor 480 SL[®] (Makhteshim Agan Zrt., visszavont engedélyű készítmény Magyarországon); Glialka Express 6H[®] (Monsanto/Bayer, 02.5/11125-2/2010, Magyarország); Glialka Star[®] (Monsanto Europe S.A., 02.5/117/1/2009, Magyarország); Glyphos Dakar[®] (Cheminova A/S, 02.5/1659/4/2009, Magyarország); Kapazin[®] (Arysta LifeScience S.A.S., 02.5/12062-2/2010, Magyarország); Medallon Premium[®] (Syngenta Crop Protection A.G., 02.5/10506-2/2010, Magyarország); Roundup[®] Classic (Monsanto Europe S.A., visszavont engedélyű készítmény Magyarországon); Roundup[®] Mega (Monsanto Europe S.A., 02.5/10493-1/2010, Magyarország) és a Total[®] (Cresco Chemical Kft., 02.5/12059-2/2010, Magyarország).

5. táblázat: A vizsgált *glyphosate*-alapú herbicid készítmények kémiai összetétele a biztonságtechnikai adatlapjuk alapján (MSDS).

Jelmagyarázat: AL – Egyéb, más folyadék (hígíthatlanul, felhasználásra készen használható); SL –Vízoldható koncentrátum; SG – Vízoldható granulátum; IPA só – Izopropilamin-só; DMA-só – Dimetilamin-só; K-só – Kálium-só; AM-só – Ammónium-só; DIAM-só – Diammónium-só.

Készítmény neve	Készítmény megjelenési formája/típusa	<i>Glyphosate</i> -sav, mint hatóanyag koncentrációja (w/w%)	<i>Glyphosate</i> -só koncentrációja (w/w%)	Formázószer(ek) / segédanyag(ok) (w/w%)	Alapengedély érvényessége Magyarországon
Barclay Gallup Biograde 360 [®]	SL	360 g/L (30,7 ± 1,5%)	485 g/L (30,7 ± 1,5%) IPA só	nem deklarált	2025.12.31.
Boom Efekt [®]	SL	360 g/L (30,8 ± 3,1%)	480 g/L (41,5%) IPA só	foszfát észter aminsó (5-15%)	2025.12.31.
Fozát 480 [®]	SL	360 g/L (30,4%)	480 g/L (41%) IPA só	nem deklarált	2020.07.15.
Gladiátor 480 SL [®]	SL	360 g/L (30,8%)	480 g/L (41,5%) IPA só	polietoxilált faggyúamin [POE(15)] (13-18%)	2016.11.30.
Glialka Express 6H [®]	AL	7,2 g/L (0,72 ± 0,11%)	9,6 g/L (1%) IPA só	pelargonsav és zsírsavak (2%)	2025.12.31.
				más felületaktív anyag, ami nem deklarált (1,5%)	
Kapazin [®]	SL	360 g/L (30,8%)	486 g/L (41,5%) IPA só	C8-10 etoxilált alkohol (<2 g/L)	2023.12.31.
				triethylenglikol-monobutil-éter (<2 g/L)	
Roundup [®] Classic	SL	360 g/L (30,7%)	486 g/L (41,5%) IPA só	polietoxilált faggyúamin [POE(15)] (15,5%)	2016.11.30.
Total [®]	SL	360 g/L (30,8%)	486 g/L (41,5%) IPA só	nem deklarált (inert összetevő)	2025.12.31.
Glialka Star [®]	SL	360 g/L (28,85 ± 1,44%)	441 g/L (41%) K só	etoxilált éter-alkilamin (6%)	2025.12.31.
Roundup [®] Mega	SL	450 g/L (34,4%)	551 g/L (42,1%) K só	etoxilált éter-alkilamin (7%)	2025.12.31.
Dominátor Extra 608 SL [®]	SL	480 g/L (39,4 ± 2,1%)	608 g/L (49,9%) DMA só	D-glükopiranoz, oligomerek, decil-oktil-glikozidok (<5%)	2025.12.31.
				dinátrium koko-amfodipropionát (<5%)	
				metil-alkohol (<1%)	
Glyfos Dakar [®]	SG	680 g/kg (6,0 ± 2,5%)	748,4 g/kg (75%) AM só	etoxilált hidrogénezett zsírsavamin (1-5%)	2025.12.31.
Medallon Premium [®]	SL	360 g/L (28,3%)	439 g/L (25-30%) DIAM só	D-glükopiranoz, oligomerek, decil-oktil-glikozidok (10-20%)	2023.12.31.

4.1.2 Akut *Aliivibrio fischeri* Microtox® citotoxicitási teszt

A vízi ökoszisztémákban megjelenő xenobiotikumok lehetséges toxicitásának mérésére különböző ökotoxikológiai bioteszteket fejlesztettek ki. Ökotoxikológiai tanulmányokban 1980 óta alkalmaznak lumineszcens baktériumot, kezdetben a *Photobacterium phosphoreum* fajt, manapság a szintén fényt kibocsátó *Aliivibrio fischeri* (AVF) (korábbi nevén *Vibrio fischeri*) baktériumot használják biológiai szenzorként (KRAMER 2009). A szabvány a *Vibrio fischeri* elnevezést, az új rendszertani besorolás azonban az *Aliivibrio fischeri* (DSM-7151, NRRL B-11177) elnevezést alkalmazza (URBANCZYK *et al.* 2007). Az AVF egy mélytengeri, pálcika alakú, sárgán pigmentált, csillókkal mozgó, szimbiózisban élő baktérium, optimális életfeltételeihez tengervizet imitáló környezetet szükséges biztosítani. A gyakorlatban a biolumineszcencia vizsgálatok közül az elsőként és legtöbbet alkalmazott baktériumtörzs az AVF. Előnye, hogy könnyű detektálni a mikroorganizmusban bekövetkező változásokat biolumineszcencia érték mérésével (toxicitás mértéke), továbbá a kapott eredmények jól reprodukálhatóak. A tesztet gyakran az első „screening” módszernek alkalmazzák gyors és költséghatékony kivitelezhetősége miatt. A teszt alkalmazható előzetes és részletes állapotfelmérésre, kockázatfelmérésre, bioremediáció követésére és az azt követő utómonitoringra. Fontos szempont, hogy a baktériumok tesztszervezetként való alkalmazása nem okoz etikai problémákat (GIROTTI *et al.* 2008). Az akut, szabvány szerinti módszer három módon kivitelezhető: 1. frissen előkészített baktériumokkal - ISO 11348-1; 2. folyadékban fagyasztott baktériumokkal - ISO 11348-2; 3. fagyasztva szárított baktériumokkal - ISO 11348-3 (FROEHNER *et al.* 2000).

A *Vibrio* nemzetségbe tartozó fajok fakultatív aerobok, melyek csak molekuláris oxigén jelenlétében biolumineszkálnak. A fény kibocsátásához rendelkezniük kell a *luxCDABEG* génekkel. A *luxA* és *luxB* gének kódolják a luciferáz enzimet. Az enzim a többi *lux* gén termékének segítségével katalizálja a szubsztrátként felhasznált oxigént, hosszú láncú alifás aldehideket (RCHO) és redukált flavinmononukleotidot (FMNH₂). A biolumineszcencia intenzitása az ATP és a NADPH intracelluláris szintjétől függ, ezáltal monitorozva a sejt anyagcseréjét. A citotoxikus és citosztatikus vegyületek a citoplazmatikus membrán károsodását, a membrán transzport rendszerek vagy az elektrontranszport lánc folyamatainak interferenciáit, sejtosztódást segítő jelátviteli rendszerek gátlását, valamint az ion gradiensek egyéb zavarait okozhatják, melyek a biolumineszcenciában bekövetkezett csökkenésként detektálhatók (COSSIO *et al.* 2012, DUNLAP 1999, MADIGAN *et al.* 2010, MIYASHIRO & RUBY 2013).



Az akut tesztet az ISO 11348-2 (2007) szabványnak megfelelően végeztem a folyadékban fagyasztott *AVF* (DSM-7151, NRRL B-11177) baktériumtörzsszel.

A törzsoldatokból 9 tagú hígítási sort készítettem 2 m/m% NaCl-ot és 1 v/v% DMSO-t tartalmazó oldattal (továbbiakban hígító oldat). Az 10 mg/mL-es *glyphosate*, AMPA és *terbuthylazine*, az 1 mg/mL-es POE(15), valamint a 25 mg/mL-es *mesotrione* és *S-metolachlor* törzsoldatokat a szabványnak megfelelő módon hígítottuk. A tesztben alkalmazott koncentráció tartományokat a következőkben leírtak szerint adtam meg: *glyphosate* és az AMPA 5,00E+02 mg/L-től 3,00E+00 mg/L-ig; *terbuthylazine* 1,00E+02 mg/L-től 6,25E+00 mg/L-ig, POE(15) 5,00E+02 mg/L-től 3,00E+01 mg/L-ig; *mesotrione* és az *S-metolachlor* 5E+02 mg/L-től 3,12E+01 mg/L-ig. Az aktív hatóanyagokat tartalmazó keverékek koncentráció tartománya (*mesotrione* + *S-metolachlor* + *terbuthylazine*) 2,25E+02 mg/L-től 1,8E+01 mg/L-ig terjedt. A *glyphosate*-tartalmú készítményeket az eredeti töménységük alapján hígítottam tovább a tesztben.

A negatív kontroll minta a hígító oldat volt. A mintákat, hígító oldatot és a rekonstitúciós oldatot a teszt során végig 15°C-on \pm 0,2°C-on tartottam. A baktérium szuszpenzió készítéséhez a -20 °C-on tárolt rekonstitúciós oldatot 15 percig 15 \pm 0,2°C-on inkubáltam. Ezt követően baktériumot 500 μ L rekonstitúciós oldattal rehidratáltam, 15 percig 15 \pm 0,2°C-on aktiválódni hagytam. Az inkubációs idő letelte után a baktériumot tartalmazó oldatot a fennmaradó rekonstitúciós oldattal elegyítettem. Az üvegeküvetákba egyenként 500 μ L baktériumszuszpenziót mértem, majd 10 perc elteltével megmértem a kezdeti fénykibocsátását (I_0) Microtox® SDI Model 500 Analyzer (SDI) típusú luminométerrel. Az I_0 bemérése után a tesztszervezethez adagoltam a negatív kontroll mintát és a hígítási sorozat tagjait 2 párhuzamos beállításban. A 30 perces expozíciós idő végén ismét megmértem a biolumineszcencia intenzitását (I_{30}). A kiindulási lumineszcencia értékhez viszonyított gátlási értékeket, amit a kontroll minta fénykibocsátás változása során tapasztalt és az alapján kialakított korrekciós faktorról a MicrotoxOmni® (1.1 verzió, AZUR Environmental Ltd.) szoftver javította. A minta által okozott gátlást azzal a hígítással fejeztem ki, amely a kontroll minta lumineszcencia intenzitásához képest 50%-os fénycsökkenést (EC_{50}) eredményezett. Az effektív koncentráció értékeket (EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{80} , EC_{90}) a MicrotoxOmni® szoftver segítségével a koncentráció-

válasz összefüggés alapján, a minta eredeti, kiindulási koncentrációjából (*glyphosate*-alapú készítmények esetében a *glyphosate*-sav és a *glyphosate*-sójában kifejezve) számítottam ki.

A TERRATOX™ adatbázis a növényvédő szerekre specializálódott adatbázis panele, mely rendelkezik a vegyületek fiziko-kémiai tulajdonságaival és toxicitási adataival (LC₅₀, LD₅₀, EC₅₀, IC₅₀ stb.) csaknem 100 vízi és szárazföldi szervezetre, több mint 5100 peszticidre és azok bomlástermékeire nézve. Az akut vizsgálatokból kapott eredményeimet a TERRATOX™ adatbázisban szereplő értékekkel hasonlítottam össze az **Eredmények fejezet, 5.1-es alfejezetében**.

4.1.3 Krónikus *Aliivibrio fischeri* citotoxicitási teszt

Az esetek 88%-ában, ha a szennyező anyag rendelkezik akut toxicitással, akkor krónikus hatása is kimutatható. Az egy fajt alkalmazó krónikus tesztek időigénye a tesztorganizmus életidejétől és reprodukciós ciklusának hosszától függ (GRUIZ és mtsai 2001).

Az általam alkalmazott, módosított és meghosszabbított kontaktidejű mikrotiter lemezre adaptált *AVF* tesztet BACKHAUS és mtsai. (1997) és FROEHNER és mtsai. (2002) tanulmánya alapján alakítottam ki. A kontaktidők meghatározásánál figyelembe vettem az *AVF* generációs idejét és a diauxikus növekedését, mivel az *AVF* két fázisú szaporodási rátával rendelkezik. A kezdeti *lag* vagy késedelmi fázisa az első 4 óra alatt következik be, amelyet egy kezdeti exponenciális fázis követ 14-15 óráig. Ezt követően egy második *lag*-fázis zajlik le a következő 2-3 órán belül, és egy második exponenciális fázissal fejeződik be legfeljebb 25 óra alatt. A mikrotiter lemezekre tervezett krónikus vizsgálat nagyobb számú minta egyidejű feldolgozását teszi lehetővé (FROEHNER *et al.* 2002).

A folyadékban fagyasztott *AVF* (DSM-7151, NRRL B-11177) törzset *Bacto Marine Broth* (BMB) (DIFCO 2216) folyékony tápoldatban (pH 7,6 ± 0,2) rehidratáltam (**M3. melléklet**). A felszaporított „*overnight*” tenyészetet átoltottam BMB ferde agarra és 4°C-on tároltam a kísérlet kezdetéig. Frissen átoltott, „*overnight*” (24 óra inkubáció 20 °C-on) tenyészetet BMB tápoldatba mostam. Az *AVF* inokulum előállításán a későbbiekben kismértékű módosítást eszközöltem: ezek szerint a -80 °C-on tárolt kultúrából 50 µL-t 50 mL BMB oldatba oltottam be, majd 20 °C-on és 170 rpm-en inkubáltam (Certomat® BS-1, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Németország) egy éjszakán (14-16 óra) keresztül. A sejtsűrűséget spektrofotométer (Genesys™ 10S UV–Vis, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) segítségével 600 nm-es hullámhosszon mért optikai denzitás alapján (OD₆₀₀) 0,1 ± 0,02 értékre állítottam be.

A **4.1.1 alfejezetben** bemutatott és elkészített törzsoldatokat és keverékeket használtam fel a krónikus vizsgálatokban. Látva, hogy nem áll rendelkezésre releváns szakirodalom, számos előkísérletet hajtottam végre, durván becsült effektív koncentráció tartományokkal. Ezen eredmények alapján választottam ki az alábbi koncentráció tartományokat - *mesotrione*: 1E+03 mg/L-től 2,0E+00 mg/L-ig, *S-metolachlor*: 2,25E+02 mg/L-től 1,8E+00 mg/L-ig; *terbuthylazine* 1,0E+02 mg/L-től 2,4E-02 mg/L-ig; az aktív hatóanyagok keverékei: 2,25E+02 mg/L-től 1,8E+01 mg/L-ig; *glyphosate*: 5,00E+02 mg/L-től 1,00E-03 mg/L-ig; AMPA: 5,00E+02 mg/L-től 1,00E-02 mg/L-ig; POE(15): 1,00E+02 mg/L-től 1,00E-02 mg/L-ig. A készítményeket hígítatlanul használtam fel, a koncentráció tartományt az eredeti *glyphosate*-só tartalomra adtam meg: 1,00E+05-től 1,00E+01 mg/L-ig.

Az oldatok megfelelő hígítását követően a 96-lyukú, lapos aljú, fekete, PS mikrotiter lemezek (Greiner Bio-One GmbH, Ausztria) celláiba három párhuzamos beállítással mértem be a hígítási sorozat tagjait. A beállított tesztrendszereket 3-5 független kísérletben ismételt meg. A minták kiadagolása után (10 µL/cella) a tesztbaktérium 190 µL-ét adagoltam a cellákba. Az oldószeres negatív kontrollt a tesztstruktúra + 10 µL oldószer [DMSO vagy steril, desztillált víz a *glyphosate*, AMPA, POE(15), *glyphosate*-alapú készítmények esetében] tette ki. Bevontam továbbá olyan kontroll mintákat a vizsgálatokba, amelyek csak *A. fischeri* tenyészetet tartalmaztak.

Ezt követően a kezdeti fénykibocsátást megmértem a 0. órában (közvetlenül a teszt összeállítása után), majd a 3,5-10-15-25 óra kontaktidő után VictorX Multilabel Plate Reader (Victor™ X Light 2030 Luminescence Reader, PerkinElmer, USA) típusú luminométerrel. A mérések között a mikrotiter lemezeket 25°C-on 250 rpm fordulaton rázatva inkubáltam (Thermo Shaker PST-60HL-4, BioSan, Lettország).

A mérések után kapott nyers adatokat matematikai-statisztikai alapokon nyugvó szoftverek segítségével elemeztem, melyet a **4.1.5 alfejezetben** fogok ismertetni.

A bontási maradékanyagok citotoxicitásának vizsgálatához biodegradációs kísérletekből kivett, lecentrifugált (4000 rpm, 4°C-on, 30 percig), majd átszűrt (0,22 µm pórusátmérőjű cellulóz-acetát fecskendőszűrőn) felülúszók képezték a mintákat a krónikus *AVF* tesztben. Ebben az esetben az *AVF* szuszpenzió optikai denzitását 0,2-es értékre állítottam be 600 nm-en. A kontroll mintákat az előzőekben leírtak szerint készítettem elő, növényvédő szer hatóanyag-mentes és mikroba mentes felülúszót használtam fel. A mikrotiter lemezek celláiba 100 µL mintát és 100 µL *AVF* szuszpenziót mértem be. A minta által okozott hígulás miatt az *AVF*

számára szükséges sókoncentrációt 10 µL tízszeres koncentrációjú BMB oldatot mértem minden cellába.

4.1.4 Direkt hormonhatás mérése *Saccharomyces cerevisiae* alapú BLYES/BLYAS bioriporterekkel

A potenciálisan ED hatású *glyphosate*, AMPA, POE(15), valamint 13 (2 már nem engedélyezett POEA-tartalmú és 11 jelenleg is forgalomban lévő) *glyphosate*-tartalmú készítmény, illetve a *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine* androgén-, ösztrogén- és citotoxikus hatásait a genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba tesztorganizmus BLYAS, BLYES és BLYR törzseivel határoztam meg vizsgálataimban. A törzseket Eldridge, M. és Sayler, G. (Tennessee Egyetem, Knoxville, USA) biztosította számunkra.

A *S. cerevisiae* BLYAS, BLYES és BLYR törzseket -80°C-on uracil- és leucin szelektív minimál tápoldatban (YMM -Yeast Mineral Medium – **M4. melléklet**) „overnight” módon, 30°C-on, 170 rpm-en rázatva tenyésztettem, az inokulumok sejtűrűségét OD₆₀₀ = 1,0 értékre állítottam be (ROUTLEDGE & SUMPTER 1996). A tiszta vegyületeket és a készítményeket 20 µL steril, desztillált vízben oldottam és hígítottam, majd 180 µL élesztő tesztstruktúrát adtam a mintákhoz, melyeket fehér lapos-aljú, 96-lyukú PS mikrotiter lemezekre (Greiner Bio-One GmbH, Németország) osztottam ki, 3 párhuzamos beállításban. A *plate*-eket 30 °C-on, 5 óráig inkubáltam. A krónikus *AVF* vizsgálatokhoz hasonlóan számos előkísérletet végeztem a hatékony koncentráció tartomány és a közvetlen ösztrogén és androgén aktivitás meghatározására. A tartomány kibővítéséhez és az eredmények finomításához legalább 12 hígítási tagot alkalmaztam. A teszteket egymástól függetlenül, 5 alkalommal ismételt meg.

Pozitív kontrollként metanolban oldott 17β-ösztradiolt (E2) és 5α-dihidrotesztoszteront (DHT) alkalmaztam a BLYES és a BLYAS tesztben. Az E2 és DHT koncentráció tartományát 1,00E-01 – 4,88E-05 és 1,00E+00 – 4,88E-04 mg/L közé állítottam be. Negatív kontrollként a hígító oldatként használt metanolt és desztillált vizet használtam. Biolumineszcenciát 5 óra elteltével mértem, amikor a biolumineszcencia válasz a legkifejezettebb, Victor™ X Light 2030 típusú (Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) luminométer segítségével.

A *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* direkt hormonális aktivitásának mérésére irányuló vizsgálatokban a vegyületek koncentráció tartománya a **4.1.3 alfejezetben** szereplő krónikus *AVF* vizsgálatokban szereplő tartományokkal azonos volt.

Az előzetes mérések alapján a tiszta *glyphosate* hatóanyag vizsgált koncentráció tartománya $2,50E+02 - 1,20E-01$ mg/L, az AMPA és a POE(15) $1,00E+02 - 2,00E-01$ mg/L volt. A készítményeket steril desztillált vízben hígítottuk. A készítmények esetében a koncentráció tartományok az eredeti *glyphosate*-só tartalom alapján a következők voltak:

- Barclay Gallup Biograde 360[®]: $1,89E+00 - 9,00E-04$ mg/L
- Boom Efekt[®]: $1,92E+03 - 2,90E-02$ mg/L
- Dominátor Extra 608 SL[®]: $3,04E+03 - 1,20E+00$ mg/L
- Fozát 480[®]: $5,00E+02 - 1,56E+00$ mg/L
- Gladiátor 480 SL[®]: $3,00E+02 - 1,56E+00$ mg/L
- Glialka Express 6H[®]: $9,60E+02 - 3,00E-04$ mg/L
- Glialka Star[®]: $3,00E+02 - 1,56E+00$ mg/L
- Glyphos Dakar[®]: $3,08E+03 - 1,52E+00$ mg/L
- Kapazin[®]: $1,20E+02 - 3,00E-03$ mg/L
- Medallon Premium[®]: $1,72E+00 - 8,00E-04$ mg/L
- Roundup[®] Classic: $2,40E+02 - 5,00E+00$ mg/L
- Roundup[®] Mega: $2,76E+02 - 5,70E+00$ mg/L
- Total[®]: $2,40E+02 - 3,75E+00$ mg/L

4.1.5 Az ökotoxikológiai tesztek statisztikai elemzése, értékelése

A tiszta hatóanyagok, keverékek, *glyphosate*-tartalmú készítmények és a biodegradációs maradékanyagok esetében a krónikus *AVF* és a direkt ösztrogén és androgén hormonhatást mérő tesztekkel kapott adatokat GraphPad Prism 7 szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) segítségével statisztikailag elemeztem. A koncentráció-válasz görbék meghatározását és az EC_x értékek kiszámítását a szoftverrel végeztem. A szigmoidális koncentráció-válasz görbéket nem-lineáris regressziós illesztéssel generáltam, az adatok logaritmikus transzformálását és %-os normalizálását követően kaptam meg. Az effektív koncentráció értékeket 4 paraméteres nem-lineáris regressziós modellel (Hill egyenlet vagy variábilis meredekségű szigmoid egyenlet) határoztam meg. Az összes adatot/értéket átlagban és szórásban is kifejeztem. A szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,05$) a kontroll és a koncentráció értékek között egyutas-ANOVA teszttel határoztam meg, amelyet Dunnett-féle többszörösen összehasonlító posztteszt követett.

A krónikus *AVF* és a *Saccharomyces cerevisiae* BLYR citotoxicitási tesztekben a minták biolumineszcencia gátlását (%) FROEHNER és mtsai. (2002) képlete alapján számoltam:

$$\text{biolumineszcencia gátlás (\%)} = \frac{(SCtx - Stx) * 100}{SCtx}$$

ahol az SCtx - a párhuzamos, oldószeres kontroll minták (SC – Solvent Control) biolumineszcencia értékeinek (CPS – Count Per Second) számtani átlaga az inkubációs idő után (tx = az adott kontaktidőnél); Stx - a párhuzamos minták biolumineszcencia (CPS) átlag értéke az adott kontaktidőnél.

Az adatokat a fentebb leírt képlet alkalmazásával, az egymástól független kísérletek átlagos százalékában fejeztem ki normalizálást követően, ahol a maximális választ 100%-nak (teljes gátlásnak) tekintettem. A negatív kontroll értékeket vettem alapértéknek (0%).

A *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS and BLYES direkt androgén és ösztrogén hatás mérésére alkalmas tesztekben a vegyületek biolumineszcencia intenzifikációját (%) a fent említett egyenlet reciprokával határoztam meg:

$$\text{biolumineszcencia intenzifikáció (\%)} = -1 * \frac{(SCtx - Stx)}{SCtx * 100}$$

Ebben az esetben a biolumineszcencia intenzifikáció (%) nem korlátozódik 100%-ra, ezért az adatokat normalizáltam (a maximális választ 100%-nak, a negatív kontrollt pedig 0%-nak vettem) az összes független kísérletben.

4.1.6 Kombinációs Index Módszer (KIM)

Az eltérő hatásmechanizmusú (MOA) vegyületek között fellépő antagonizmust, addíciót, illetve szinergizmust a Kombinációs Index Módszerrel határoztam meg. A módszer nem csak különböző MOA-val bíró anyagok vizsgálatát teszi lehetővé, de számos, akár eltérő arányban jelen lévő anyag együttes hatásai modellezhetőek, melyet az empirikus adatokkal összevetve meghatározhatók a vegyületek egymásra gyakorolt hatásai. A növényvédő szerek együttes expozíciója esetén a szinergista, additív, valamint az antagonista hatásokat számszerűsítő KI értékek kvantitatív módon a KI egyenlet (CHOU 2006), valamint a CompuSyn szoftver (The ComboSyn, Inc.) segítségével határozhatóak meg (CHOU & MARTIN 2005), ahol:

$$n_{(CI)_x} = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n}\{[D]_j / \sum_1^n [D]\}}{(D_m)_j \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}}$$

$(CI)_x$ – az „n” vegyület Kombinációs Indexe (CI) x % -os gátlási rátával

$(D_x)_{1-n}$ – az „n” vegyület koncentrációjának összege, amely a keverékben x %-os gátlást okoz

$\{[D]_j/\sum_1^n [D]\}$ – az „n” vegyület egyedi koncentrációjának aránya, amely a keverékben x %-os gátlást okoz, és

$(D_m)_j \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}$ – az egyes vegyületek koncentrációja, amely x %-os gátlást okoz(nak), ahol,

D_m – a medián-hatás koncentráció (a medián- hatás görbe x tengelymetszetének antilogaritmus),

f_{ax} – a részleges gátlás x %-os gátlásnál,

m – a medián-hatás görbe meredeksége.

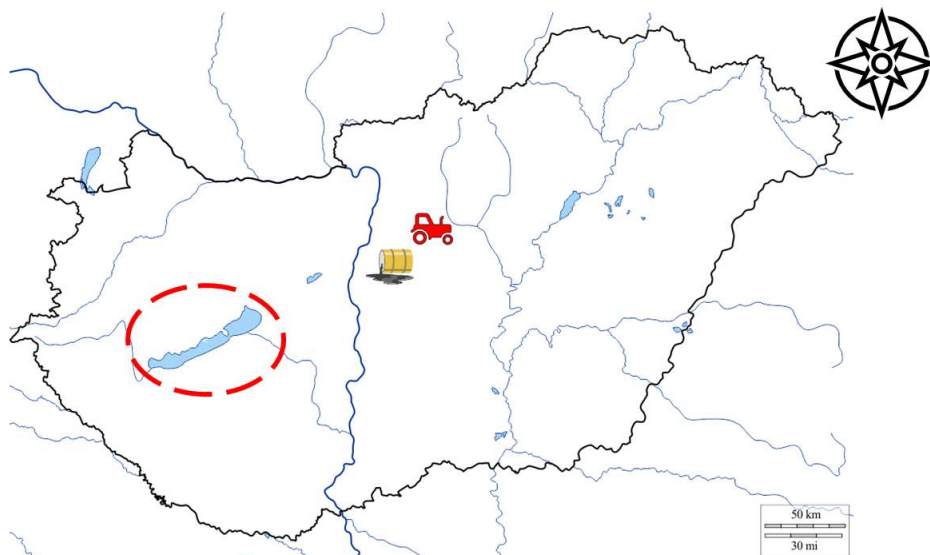
A szoftver segítségével a KI értékek mellett meghatározhatóak a koncentráció-válasz görbék paraméterei is (m – a szigmoiditás kvantitatív becslése, r – regressziós koefficiens). A közös hatások pontos megállapítása céljából legalább 5 koncentráció-válasz adatpontot (EC_{x1} , EC_{x2} , EC_{x3} , EC_{x4} , EC_{x5}) szükséges megadni. A keverékek hatásai a kapott KI értékek alapján egy részletes, KI tartományrendszerbe sorolhatóak és kvalitatív módon osztályozhatóak az együttes hatások erősségétől függően (CHOU 2006). A kvalitatív módon minősítő tartományrendszer CHOU & TALALAY (1984) szerint a következő: szinergizmus áll fenn, ha a KI érték < 1 , additív hatás áll fenn, ha a KI érték = 1, és antagonistikus hatás, ha a KI érték > 1 . CHOU (2006) részletesebb osztályozást adott meg a tartományértékekkel kapcsolatban, amely a következő: $< 0,1$ – nagyon erős szinergizmus; $0,1 - 0,3$ – erős szinergizmus; $0,3 - 0,7$ – szinergizmus; $0,7 - 0,85$ – mérsékelt szinergizmus; $0,85 - 0,90$ – gyenge szinergizmus; $0,90 - 1,10$ – additív; $1,10 - 1,20$ – gyenge antagonizmus; $1,20 - 1,45$ – mérsékelt antagonizmus; $1,45 - 3,3$ – antagonizmus; $3,3 - 10$ – erős antagonizmus; > 10 – nagyon erős antagonizmus.

4.2 A növényvédőszer hatóanyagok biodegradációjára és biodetoxifikációjára irányuló vizsgálatok

4.2.1 A mintavételi helyszínek és mintavételezés

A 2013 és 2019 közötti időszakban környezeti mintákat vettem a peszticideket potenciálisan biodegradálni és biodetoxifikálni képes baktérium törzsek izolálása céljából. A környezeti mintavételezés a Magyar Szabványoknak megfelelően történt különböző mezőgazdasági és ipari területek környezeti elemeiből, úgy, mint felszíni- és felszín alatti vizek, földtani közegek (MSZ

21464:1998. Mintavétel felszín alatti vizekből; MSZ 5667-4:1995. Mintavétel a természetes és mesterséges tavakból; MSZ 21470-1:1998. Környezetvédelmi talajvizsgálat mintavétel). Össességében 34 mintavételi helyről származó környezeti mintát vettem és dolgoztam fel. Egy tematikus Magyarország térképen piros kör alakzattal és piktogramokkal jelöltem a három, vizsgált mintavételi helyszínt, melyet a 4.2.1.1, 4.2.1.2, és 4.2.1.3 alfejezetekben mutatok be részletesebben (13. ábra).



13. ábra: A mintavételi helyszínek elhelyezkedése és jelölése Magyarország tematikus térképén.
Forrás: saját készítésű ábra

Doktori disszertációm alapját képezi a MSc. diplomadolgozatomban bemutatott két mintavételi helyszínről [gödöllői Talajvédelmi és Információs Monitoring (TIM) és az egykori Budapesti Vegyiművek (BVM)] izolált és azonosított mikrobafajok egy része, mely helyszínek bemutatásától eltekintek a dolgozatomban (TÓTH 2015).

4.2.1.1 Közép-magyarországi szénhidrogénnel szennyezett kárhely

Környezeti mintáim egyik származási helye egy szénhidrogénnel szennyezett közép-magyarországi kárhely volt, melynek létrejöttét egy távvezeték szakasz meghibásodásából eredő havária eredményezte. A helyszín részletes tényfeltárási záródokumentációja szerint a szennyezett monitoring kutak talajvíz szennyezettsége a kémiai-analitikai vizsgálati eredmények alapján igen jelentős. A kárhely területéről származó felszín alatti vízmintákat a kármentesítési feladatokat ellátó cég munkatársai akkreditált módon vették meg és biztosították számomra (2015. szeptember 18.), melyek három, szennyezett monitoring kútból származtak (BUT-1 [EOV y: 654777, EOV x: 213231], BUT-2 [EOV y: 654767, EOV x: 213235], BUT-3 [EOV y: 654768

EOV x: 213223]), a szennyezés gócahoz közeli furatokból. A kezdeti tényfeltárás első lépésében megállapított benzol-, toluol-, etilbenzol-, xilol- (BTEX vegyületek) és az összes ásványi szénhidrogén (TPH) tartalom a vízmintákban >2000 µg/L volt, valamint a furatokban lévő víztesten felúszó szénhidrogén fázis volt detektálható.

A háromszoros kúttérfogat kitermelése gépi szivattyúk segítségével történt, ezt követően kézi, felrántó zsinórral rendelkező, rozsdamentes acél *bailer*-rel vették meg a szükséges mintákat a fentebb említett cég alkalmazottai a fentebb ismertetett szabványoknak megfelelően. A mintavételi edényeket légmentesen lezárták és eljuttatták a vizsgálatokat végző laboratóriumunkba. A mintákat laboratóriumba érkezést követően fénytől elzárta, +4 és +5 °C között tároltam a vizsgálataim kezdetéig.

4.2.1.2 Cegléd – intenzív gazdálkodású mezőgazdasági terület

2016-ban a Dél-Pest Megyei Mezőgazdasági (DPMG) Zrt. tulajdonában, intenzív mezőgazdasági művelés alatt álló, Cegléd külterületén található, 41 hektáros területről összesen 18 környezeti mintát vettem. A DPMG Zrt. akkoriban több, mint 6000 ha-on gazdálkodott, a kalászos gabonák mellett a takarmánykukorica, repce, napraforgó, valamint szálas- és tömegtakarmány termesztése volt a meghatározó. A területeiket természeti adottságok szempontjából az aszályos és változékony időjárás, a heterogén talajminőség és a földek Pest megye déli részén való szétszórtsága jellemzi. Nyugati határát Ceglédbercel, míg keleti és déli határát a tiszai árterület, illetve a kiskunsági homokbuckák jelentik. A mintavételi területünk a VIII. számmal jelölt tábla, mely vetésforgós termesztés alatt álló (kukorica és lucerna) takarmánykukorica kultúrával vetett terület volt. A tábla talajának a fizikai-kémiai állapota egy rendelkezésünkre bocsátott 2014-es adatsor alapján a következőképpen jellemezhető: kémhatás szempontjából gyengén lúgos (7,54) agyagos vályog (K_A : 47), gyengén szoloncsákos (össz sótartalom: 0,0078 %), közepesen meszes (Ca: 14,3 %), jó humusz ellátottságú (3,16 %), szikesedésre hajlamos (Na: 112 mg/kg), jó P_2O_5 és K_2O ellátottsággal bíró talaj.

A kapilláris zóna 1,7–1,8 méteren, a talajvíz szint 2–3 méteren található. A domborzati viszonyokat tekintve a szóban forgó terület 60 méterenkénti 20 cm-es eséssel rendelkezik. A megállapított talajvíz áramlás É-Ny-i irányú. A mezőgazdasági parcella mellett található Felső-Perje nevű mellékcsatorna vízelvezető árkából, 30 cm-es mélységből 2 üledékmintát vettem (minta jelölések: VIII. ISZ.1, VIII. ISZ.2), melyeket barna, teflon szeptummal ellátott porüveg edénybe helyeztem ~200 g mennyiségben. A művelt talajrétegből (0-30 cm) 13 talajmintát, ebből 12-t a tábla szélétől számított 10-15 méterre (minta jelölések: VIII. 1-12), egyet a tábla becsült

középpontjából (minta jele: VIII. K.) vételeztem talajfúró segítségével. A tábla középpontjában található kapilláris zónából 1,8–2,0 m mélységből is vettem talajmintát (minta jele: VIII. KZ.). A talajmintákat, az üledékmintákhoz hasonló módon 200 g térfogatú porüvegekbe gyűjtöttem. Ebből a mélységből, a talajvizet tartalmazó zónából kettő felszín- alatti vízmintát is vettem acél *bailer* segítségével, műanyag kupakkal záródó 0,5 L térfogatú barna, boroszilikát üvegedényzetbe (minta jele: VIII. TV.) (14. ábra).



14. ábra: A ceglédi, mintázott mezőgazdasági tábla mintavételi pontjai.
 Forrás: GOOGLE EARTH, saját készítésű ábra.

A környezeti mintákat hűtőtáskákba gyűjtve, hűtőtasakkal körülvéve tároltam a laboratóriumba történő szállításukig. A területről származó felszín alatti vízmintát beszállítottam a Wessling Hungary Kft.-hez multipesztcid kémiai-analitikai vizsgálat céljából. A mintavétel után 4°C-on tároltam a mintákat további mikrobiológiai vizsgálatokig.

A területen évente, akár több alkalommal alkalmaztak ammónium-nitrát, NPK, vagy kálisó műtrágyát. A mintavételt megelőző években, hónapokban (2005-2016. év) több alkalommal juttattak ki a *glyphosate*, *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine* hatóanyagokat tartalmazó peszticid készítményeket a permetezési napló szerint, melyet az **M5.** és **M6. mellékletekben** tüntettem fel.

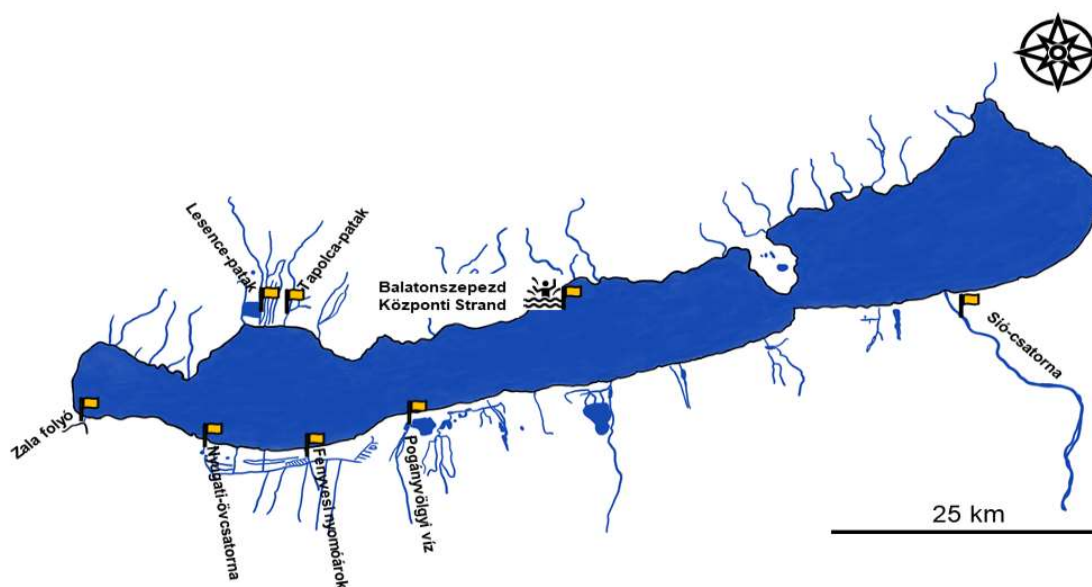
4.2.1.3 Balaton részvízgyűjtő területén található befolyó és elfolyó vízfolyások

A GINOP-2.3.2-15-2016-00004 számú és „A balatoni horgászati célú halgazdálkodás fenntarthatóvá tételének megalapozása a halfauna rekonstrukciója és a táplálékbázis hasznosulásának vizsgálatával alap- és alkalmazott kutatási módszerekkel” című pályázat kutatási munkáiba kapcsolódva, részt vettem a Balatonon, valamint a be- és elfolyó vízfolyásain

történő mintavételi helyek kijelölésében, a területi növényvédő szer monitoring által kapott adatok értékelésében. A megismert adatok és eredmények tükrében mikrobiológiai vizsgálatok céljából felszíni víz és mederüledék mintákat vettem (2018. július 10.) összesen 7 helyszínről (6. táblázat, 15. ábra).

6. táblázat: Mintavételi helyszínek és GPS koordinátáik.

Mintavételi helyszín neve (lokáció)	Mintavételi helyszín GPS koordináta
Pogányvölgyi-víz (Fonyód)	46.74949, 17.56908
Balatonfenyvesi-nyomóárok (Balatonfenyves)	46.70752, 17.48066
Nyugati-övcsatorna (Balatonkeresztúr)	46.69754, 17.38302
Zala folyó (Balatonba érkező torkolatnál)	46.70172, 17.25849
Lesence-patak (Balatonederics)	46.80309, 17.40414
Tapolca-patak (Szigliget)	46.80719, 17.42925
Balatonszepezd Központi Strand (Balaton)	46.852173, 17.665811



15. ábra: A Balaton részvízgyűjtő területén kijelölt mintavételi helyek.
Forrás: saját készítésű ábra.

A mikrobiológiai célzatú mintavételünket megelőző, HPLC-MS/GC-MS-sel végzett multipeszticid analitikai mérések (Wessling Hungary Kft.) több esetben detektálták a disszertációm alapját képező növényvédő szer hatóanyagokat és azok bomlástermékeit.

A víz és üledékmintákat egy hosszabbítható szárú teleszkópos nyélre rögzített, félig nyitott merítőhengerrel vettem. A nedves iszapot 200 g térfogatú steril porüvegekbe, a vízmintákat műanyag kupakkal záródó 0,5 L térfogatú barna, steril boroszilikát üvegedényzetbe helyeztem

el. Az üvegedényzeteket fénytől elzárva, hűtve tárolva juttattam el a laboratóriumba, ahol +4 és +5 °C között tárolták a vizsgálatok kezdetéig, maximum 2 napig.

4.2.2 Mikrobák izolálása környezeti elemekből

A klasszikus tenyésztéses eljárások során alkalmazott táptalajok vagy dúsító közegek mindig szelektívek és sosem tudják leképezni az eredeti mikrobaközösségek pontos összetételét. Elsődleges céloom olyan baktériumtörzsek izolálása volt, amelyek szennyező anyagok jelenléte miatt megváltozott környezeti feltételekhez adaptálódtak és szaporodásra képesek. A dúsításos technikán alapuló vizsgálataim során az adott dúsító közegbe oltott környezeti mintát környezeti szempontból nem releváns (környezetben nem megtalálható) növényvédő szer koncentrációkkal kontamináltam (szelekció során szén- illetve nitrogénforrásként hasznosítható).

A 2015. szeptemberében a közép-magyarországi szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről érkezett három, üledékben gazdag talajvíz mintákból 10 mL-t 90 mL steril desztillált vizet és rázó üvegyöngyöket tartalmazó 300 mL-es Erlenmeyer lombikokba mérve 1 óráig horizontális, kör-sík rázatógépen 180 rpm fordulatszámom szobahőmérsékleten rázattam (**4.2.1.1 Közép-magyarországi szénhidrogénnel szennyezett kárhely**).

A 2016. júniusában a ceglédi mintaterületről vett szilárd mintákból (talaj, üledék) 1 g-ot, a talajvíz mintákból 1 mL-t 150 mL OIR III tápoldatba (**M7. melléklet**) mértem szelekciós céllal. A kísérleteim során összesen 17 darab, üvegyöngyökkel ellátott 300 mL-es lombikba összeállított mikrokozmoszt állítottam be. A beállított összpeszticid koncentráció 100 mg/L (*glyphosate, mesotrione, S-metolachlor, terbuthylazine*) volt üvegenként. Továbbá, a kapillaris zónából vett talajmintával (VIII. KZ. [100 g]) és a talajvíz mintával (VIII. TV. [100 mL]) beoltottam 1-1 400 mL mennyiségű OIR III tápoldatot is. A hozzáadott peszticid koncentráció ebben az esetben is 100 mg/L (*glyphosate, mesotrione, S-metolachlor, terbuthylazine*) volt. A dúsító kísérletek 7 napig, szobahőmérsékleten (22-24°C) inkubálva- rázva (180 rpm) folytak.

A 2018. júliusában, a Balatonból és részvízgyűjtő területéről származó 7 mintavételi helyszín víz- és üledékmintáját dolgoztam fel. 90 mL steril desztillált vizet és üvegyöngyöket tartalmazó lombikokhoz 10-10 g nedves tömegű, homogén üledéket adtam. A vízmintákat eredeti állapotukban hagyva, tovább nem hígítva (10^0) 100-100 mL-t kimérve adagoltam ki üres, steril lombikokba. A lombikok tartalmát egységesen és egyenként 200 mg/L végkoncentrációban *terbuthylazine*-nal szennyeztem el, valamint további három *glyphosate* tartalmú készítménnyel (Fozát 480[®], Gladiátor 480[®] SL, Gialka Star[®]) kontamináltam 50 µL - 50 µL - 50 µL mennyiségben (beállított *glyphosate*-sav koncentrációja: 180 mg/L készítményenként). A

szuszpenziókat 7 napig szobahőmérsékleten (23 °C – 25 °C) rázatva (180 rpm) homogenizáltam, létrehozva ezáltal feldúsult tenyészeteket.

A kezdeti mintafeldolgozást követően a mikrobiológiai vizsgálatok során a szelektív/dúsító kísérletekből származó felszíni víz-, talaj-, üledék-, és talajvíz minták összes élő, tenyészhető sejtszámát (CFU/mL) Luria-Bertani (LB) táptalajon és/vagy TGE-5 táptalajon (lásd az **M8.** és **M9. mellékletekben**) határoztam meg. Egy általános tízes alapú hígítási sor tagjaiból ($10^2 - 10^9$) 1-1 mL-t petricsészékbe pipettáztam, majd kézmeleg tápagarral felöntve elkevertem azokat tartalmát, szilárdulás után 28°C-on 72 óráig inkubáltam termosztátban. A kifejlődött mikroba telepeket leszámoltam, hozzárendelve az ahhoz tartozó és megfelelő hígítási taghoz. A telepeket fenotípusos alapon, telepmorfológiájuk szerint elkülönítve átoltottam általános táptalajokat tartalmazó (LB és/vagy TGE-5) Petri csészékbe, melyeket 28°C-on 72 óráig inkubáltam termosztátban. A tiszta izolátumokat ezután 30 mL LB vagy TGE-5 tápoldatot tartalmazó 100 mL-es Erlenmeyer lombikokba oltva (28°C-on 72 óráig 170 rpm fordulaton rázatva-inkubálva) felszaporítottam. A folyékony tenyészetekből egyenként 650 µL-t pipettáztam át steril 1,5 mL-es Eppendorf csövekbe 650 µL 30%-os steril glicerinnel 1:1 arányban elkeverve. Az így előkészített mikrobatörzseket -80°C-on deponáltam további vizsgálatokig.

4.2.3 Az izolált baktériumtörzsek faj szintű identifikációja 16S rDNS alapon

Az izolált mikroszervezetek genomi DNS-ének kivonása érdekében UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit-et (MoBio Laboratories Inc., USA) alkalmaztam, melynek protokollját követve hajtottam végre a DNS izolálást folyékony, „overnight” baktériumtenyészetből. Ezt követően PCR eljárás segítségével amplifikáltam a faji identifikációhoz szükséges 16S rDNS gént.

A PCR MasterMix összetétele egy reakcióelegyre számolva 50 µL végtérfogat mellett: 1 µL DNS templát, mely tartalmazza az amplifikálandó célszekvenciát; 1-1 µM univerzális *Bacteria* doménspecifikus, 27f *forward* (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') és 1492r *reverz* (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT- 3') primer; 1,25 U DNS-polimeráz enzim [*Dream Taq DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific, USA)]; 5 µL Taq-puffer (Thermo Fisher Scientific, USA); 4mM dextroribionukleotid-trifoszfátok (dNTP; 32,75 µL nagy tisztaságú, nukleáz-mentes (MQ) víz.

A PCR reakció *Eppendorf Mastercycler*® (Eppendorf, Hamburg, Németország) típusú készülékben zajlott a következő hőprofil szerint: 95°C 3', 32x (94°C 30'' 52°C 30'' 72°C 1'),

72°C 10', 4°C ∞. A PCR reakció sikerességének, illetve a termékek szemi-kvantitatív ellenőrzése gélelektroforézissel történt 1%-os agaróz gélben.

A 16S rDNS amplifikált célszekvencia minőségi meghatározása céljából a mintákat a PCR reakcióból visszamaradt reakciómaradványoktól és alkotóktól (*DreamTaq* polimeráz enzim, Taq-puffer, dNTP, primer dimerek) *NucleoSpin® Extract II DNA Clean-up Kit*-tel (Macherey-Nagel, Németország) tisztítottam meg. A tisztított termékeket agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztem, majd Sanger-féle láncterminációs szekvenáló reakcióhoz templátként használtam fel. A Sanger-féle láncterminációs szekvenálással a 16S rDNS célszekvencia pontos nukleotid sorrendjét állapítottam meg, *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit®* (Applied Biosystems, USA), és *Eppendorf Mastercycler®* készülék felhasználásával. A fluoreszcens festékkel jelölt dideoxi-nukleotidok lézeres gerjesztéssel detektálhatók, kapilláris gélelektroforézis segítségével meghatározható a célszekvencia. A szekvenáló reakcióelegy egy mintára és 10 µL végtérfogatra számítva a következő volt: 1 µL Big Dye; 1,5 µL Big Dye puffer; 0,5 µL primer (27f, illetve 338f és 803f); 3,5 µL DNS templát (tisztított PCR termék); 3,5 µL MQ-víz. A szekvenáló reakció hőprofilja a következő paraméterekkel zajlott: 96°C 1', 28x (96°C 10'' 51°C 5'' 60°C 4'), 4°C ∞. Reakcióelegyenként egy primert használtam fel (27f vagy 338f vagy 803f). A szekvenáló primerek szekvenciái a következők voltak (27f: [5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'], 338f: [5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3'], 803f: [5' - ATTAGATACCCTGGTAGTC - 3']). A három primer alkalmazásával a teljes 16S rDNS gén szekvenciája lefedhető. A végeredményként a teljes 16S rDNS szekvencia hozzávetőlegesen 1400-1500 bázispárból tevődik össze, melyből a meghatározni kívánt baktériumtörzs ≥99% pontossággal azonosítható.

Ezt követően a jelölt DNS visszanyerésének céljából etanolos precipitálással megtisztítottam a szekvenáló PCR reakcióban keletkezett termékeket. A végterméket acetát mix-szel [3 µL NaAc (3M); 14,5 µL MQ-víz; 62,5 µL EtOH (95%)] elegyítettem és szobahőmérsékleten 10 percig történő inkubálás után 4°C-on 4000 rpm fordulaton 30 percig centrifugáltam (Eppendorf Centrifuge 5810R). A centrifugálási eljárás után a felülúszó fázist leöntöttem, majd mintatartó csövekbe 180 µL 70%-os EtOH-t adagoltam ki, ezt követően az előzőekben leírt centrifugálás és felülúszó frakció eltávolítása következett. A mintatartó csövek aljában visszamaradt EtOH teljes eltávolítása után a precipitált DNS-re 20 µL Hi-Di formamidot (Thermo Fischer Scientific, USA) pipettáztam. A kapilláris gélelektroforézisre előkészített mintákat 24 óráig 4°C-on inkubáltam.

Az *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA) készülékkel, láncterminációs módszerrel végeztem a szekvenálást. A teljes 16s rDNS szekvenciát több, rövidebb rész-szekvencia összeillesztésével kaptam meg MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) szoftver segítségével. Végző lépésként a kapott szekvenciákat az EzTaxon nemzetközi adatbázisába (ezbiocloud.net) feltöltöttem, ismert és validált szekvenciákkal hasonlítottam össze. 98%, vagy afeletti homológia esetén tekintettem az adatbázisban megtalálható fajokhoz besorolhatónak a baktériumtörzseimet.

4.2.4 Biodegradációs kísérletek

Az alkalmazott biodegradációs kísérletek első lépésben az előzetesen **4.2.1 fejezetben és alfejezeteiben** bemutatott helyszínekről izolált és identifikált, valamint szakirodalmi kutatásom szerint szerves, aromás és halogén tartalmú xenobiotikumok biológiai lebontására képes mikrobák leválogatását végeztem el, figyelembe véve a humán- és környezetegészségügyi szempontú veszélyességi besorolásukat. Kísérleteimben szerepelt 18 általam izolált és identifikált („BUT”, „ISZ”, „TV”, „N” jelzéssel ellátott), továbbá a *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó 44 típus törzs, valamint a Környezetbiztonsági Tanszék birtokában lévő egyéb baktérium nemzetségek képviselői (6 „R” és 9 „T” jelű törzsek a diplomamunkám során korábban meghatározott fajok; 1 *Cupriavidus sp.*; 1 *Olivibacter sp.*; 7 *Rhodococcus sp.*; 1 *Stenotrophomonas sp.*; 3 *Streptomyces sp.*), melyekről számos esetben igazolták Környezetbiztonsági Tanszék munkatársai, hogy kiváló biodegradációs és biodetoxifikációs képességgel rendelkeznek különböző típusú toxikus szennyező anyaggal (szénhidrogének, 5 α -dihidrotesztoszteron, *atrazine**, mikotoxinok) szemben (SZABÓ *et al.* 2011, BALÁZS *et al.* 2014, HÁHN *et al.* 2017, RISA *et al.* 2018).

4.2.4.1 Aerob/oxigénnel ellátott körülmények között végzett biodegradációs kísérletek

A vizsgálatba vont baktérium törzseket LB vagy TGE-5 tápagarra (**M8. és M9. mellékletek**) szélesztettem. Ezt követően 28 °C-on 72-96 órán keresztül termosztátban inkubálva a törzseket, megvizsgálva a kifejlődött telepek tisztaságát, 1-1 telepet 30 mL LB tápoldatba oltottam és 72-96 óráig, 28 °C-on, 170 rpm fordulatszámon rázatva inkubáltam azokat. Az inokulumok sejtsűrűségét *Genesys™ 10S UV-VIS Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, US) típusú spektrofotométer segítségével 600 nm-es hullámhosszú fény abszorbanciája alapján LB tápoldattal OD=0,6 értékre állítottam be. Az inokulumokból 5-5 mL-t mértem be 45 mL steril, LB tápoldatot tartalmazó 300 mL térfogatú lombikokba. Ezt követően a növényvédő szer

hatóanyagokból egyenként 2,5 mg/mL törzsoldatot készítettem, majd 100-100 µL-t mértem a lombikokba 5 mg/L-re beállítva a peszticid végkoncentrációját. A kísérletek során 50-50 mL mikrobamentes, csak peszticidet tartalmazó tápoldatot használtam kontrollként. Az összeállított közegeket 7 napon keresztül 28 °C-on, 170 rpm-en rázattam, majd 10-10 mL-t mintát vettem belőlük 15 mL-es centrifugacsövekbe, melyeket 4000 rpm fordulatszámon (*Eppendorf Centrifuge 5810R*), 4 °C-on, 35-40 percig centrifugáltam. A teljes bakteriális szuszpenziókat szétválasztottam a vizes felülúszó fázisra és a teljes bakteriális biomasszára, melyre azért volt szükség, hogy a felülúszóból visszamért hatóanyag mennyiségből megállapíthassam a biodegradáció mértékét. A felülúszó frakciót miután elválasztottam a pelletektől 0,22 µm pórusátmérőjű cellulóz-acetát fecskendőszűrőn keresztül (VWR Europe) szűrtem át. A felülúszó frakciók egy részét, valamint a pellet mintákat kémia-analitikai vizsgálatra tovább küldtem a Wessling Hungary Kft. számára, ahol műszeres analitikai méréseket végeztek a mintákon a **4.2.5 fejezetben** bemutatottak szerint. A peszticidek pelleten történő kötődését a minták teljes pelletmennyiségének extrahálásából határozták meg (**4.2.5 fejezet**). Annak meghatározása érdekében történt mindez, hogy a herbicid hatóanyagok bontási rendszerekből történő eliminációja csupán csak a baktériumok sejtfalán való megkötődésének vagy valóban a biodegradációnak köszönhető. A biodegradációs hatékonyságot leképező értékeket, valamint a baktériumpelleteken megkötődött peszticid koncentrációjának értékét az abiotikus kontroll mintákhoz viszonyítva számoltam ki.

A biológiai lebontási vizsgálatokat kezdetben egy beállításban végeztem el, amennyiben a degradáció mértéke meghaladta a 30%-ot, vizsgálataimat három párhuzamos beállításban megismételtem. A felülúszó minták másik részét a biológiai hatásmérő tesztekben használtam fel, a kísérletek kezdetéig -20 °C-on tároltam azokat.

4.2.4.2 Mikroaerob/oxigénlimitált körülmények között végzett biodegradációs kísérletek

A mikroaerob/oxigénlimitált körülmények között zajló bontási kísérleteimben azokat a baktériumtörzseket alkalmaztam, amelyek az aerob/oxigénnel ellátott körülmények között zajló vizsgálataimban legalább 40%-os degradációs potenciállal rendelkeztek három párhuzamos ismétlésből kapott eredmények alapján. Az inokulumok előállítása a **4.2.4.1 számú alfejezetben** leírtak szerint történt. A kísérleteket 100 mL térfogatú szérüművegekben állítottam össze, amelyhez 50 mL steril, FAHY tápoldatot (*Mineral salts medium* – ásványi só tápoldat részletes leírás a **M10. mellékletben**) mértem ki (FAHY *et al.* 2006). Az üvegedényzet falára szilikonalapú ragasztóval helyeztem fel és rögzítettem az autoklávozással sterilizálható,

lumineszcens oxigén mérőszenzor spotokat (*Oxygen Sensitive Spot SP-PSt3-YAU-D5-YOP*, Presens Precision Sensing GmbH, Németország), amelyekkel a közegben történő oxigén koncentráció változásának nyomon követése nem-invazív módon történik. A **4.2.4.1 alfejezetben** bemutatott peszticid törzsoldatokkal (2,5 mg/mL) dolgozva a tápoldatok herbicid hatóanyag végkoncentrációját 5 mg/L-re (100 µL) állítottam be.

A FAHY-tápoldatot tartalmazó szérüművegeket 20 mm-es, butil-üreges dugaszokkal és a tetejükre krimpelhető alumíniumkupakokat (D20/10mm) helyezve légmentesen lezártam, majd az oxigént N₂/CO₂ 80:20 térfogat arányú gázkeverékkel hajtottam ki injekciós tű (*Sterican*[®] *B.Braun* G 21 x 4 3/4"/ø 0,80 x 120 mm) segítségével. A szérüművegekbe ezután 5 mL-es fecskendőre erősített 0,22 µm pórusátmérőjű cellulóz-acetát fecskendőszűrőn keresztül levegőt juttattam 0,5±0,1 mg/L oxigénkoncentrációt beállítva, ezáltal mikroaerob/oxigénlimitált körülményeket létrehozva. Ezt követően 100 µL baktériuminokulum (optikai denzitás= 0,6) befecskendezése történt a lezárt szérüművegekbe a szeptumdugón keresztül inzulin fecskendővel (*Chirana*[®] *T. Injecta*, 1 mL, 29Gx1/2", 0.33x12mm). Az oxigén koncentrációt napi rendszerességgel monitoroztam (naponta kétszer) és abban az esetben, ha a mikroorganizmusok oxigént használtak fel az életfolyamataikhoz, azt napi rendszerességgel visszapótoltam, beállítva a kezdeti koncentrációt (0,5 ± 0,1 mg/L). Az oxigénkoncentrációt az üvegek falára ragasztott spotok, *Fibox 3 Oxygen Meter* műszer, valamint *OxyView-PST3-V7.01* szoftver (Presens Precision Sensing GmbH, Németország) segítségével detektáltam (**16. ábra**).



16. ábra: Az oxigén mérésre alkalmas rendszer felépítésének sematikus ábrája a gyártó által deklaráltak szerint.

Forrás: Presens Precision Sensing GmbH, Németország.

Az oxigénlimitált bontási kísérleteim 7 napon keresztül, 28°C-on, 170 rpm fordulatszámon rázatva-inkubálva zajlottak. Az analitikai és biológiai hatásmérő vizsgálataimhoz levett minták előkészítése és kezelése az előző fejezetben leírtak szerint történt.

4.2.5 Akkreditált kémiai-analitikai vizsgálatok

Az akkreditált kémiai-analitikai vizsgálatokat a *glyphosate*, *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* vegyületek detektálása esetében a Wessling Hungary Kft. (1045 Budapest, Anonymus u. 6.) végezte. A hatóanyag maradékok meghatározása három különböző frakcióból történt: baktériumszuszpenzió, felülúszó és pellet frakció. A Wessling Hungary Kft. laboratóriuma a *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* méréséhez szükséges szabványosított MSZ EN 15662:2009 módszert alkalmazta, mely során GC-MS/MS és/vagy LC-MS/MS készülékeket használt. A *glyphosate* mérése a WBSE-90:2016 módszerrel, valamint LC-MS/MS-sel történt.

A vizsgáló laboratórium (Wessling Hungary Kft.) módszere szerint a herbicid hatóanyag meghatározáshoz a mintatartó edényeket átöblítették acetonnal, ezekből az acetonos oldatokból határozták meg (hígítás után) az egyes mintatartó edények falára adszorbeálódott vegyület tömegét. Az extraktumokból tájékozódó mérést végeztek, és térfogatukat úgy módosították 25-szörös acetonos hígítással, hogy a mérendő vegyület koncentrációja 0-2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ tartományban legyen. A mintatartó edények száradás utáni tömegét lemérve, és azt a beérkezett minták tömegéből levonva kapták meg a beérkezett minták (szuszpenzió, felülúszó, pellet) abszolút tömegét. A minták abszolút tömegeinek és sűrűségeinek ismeretében számolták ki az egyes beérkezett minták térfogatát. Ennek, valamint a kivett alminták térfogatának és mért vegyület-koncentrációinak ismeretében számolták ki az egyes mintákban található vegyület abszolút mennyiségét.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Herbicid hatóanyagok, keverékek és készítmények biológiai hatásmérésén alapuló ökotoxikológiai tesztek

5.1.1 Akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* citotoxicitási tesztek (*mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*)

A tiszta hatóanyagok és hatóanyag keverékek (*mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*) koncentráció-válasz összefüggéseik alapján az EC₅₀ toxicitási értékeket (mg/L) a **7. táblázatban** foglaltam össze. Az eredményeimet a hatóanyagokra vonatkoztatva összehasonlítottam a TERRATOX™ adatbázisban (TerraBase, Inc.) és a külföldi szakirodalomban megtalálható adatokkal.

A három vizsgált herbicid hatóanyagának akut toxicitása növekvő sorrendben a következő: *terbuthylazine* (nem-toxikus), *S-metolachlor* (265 mg/L), *mesotrione* (118 mg/L). A *terbuthylazine* esetében a legnagyobb alkalmazott koncentráció (100 mg/L) esetében sem tapasztaltam toxikus hatást, sőt, a kontaktidő 30. percében mért fénykibocsátásnál intenzifikációt detektáltam a legnagyobb koncentrációjú minta esetében. Az akut vizsgálatból származó és az irodalomban megtalálható EC₅₀ értékek között figyelemreméltó különbségek láthatók. A TERRATOX™ adatbázisban nem található a *terbuthylazine AVF* tesztszervezet akut biolumineszcencia gátlására vonatkozó értékek. Eredményeim *S-metolachlor*-ra nézve jól korrelálnak a szakirodalomban és a TERRATOX™ adatbázisban található értékekkel, szemben a *mesotrione*-nal, ahol az adatok jelentősen különböznek egymástól (**7. táblázat**). Az azonos arányban (1:1) elegyített keverékek magasabb toxicitást eredményeztek, mint a készítmények összetétele szerint keverték. A *mesotrione* + *S-metolachlor* + *terbuthylazine* mix 1:1:1 arányban keverve 56 mg/L-nél eredményezett 50%-os biolumineszcencia gátlást, míg ugyanezt a hatást a 1:10:3 arányú *mesotrione* + *S-metolachlor* + *terbuthylazine* mixtúra 136 mg/L koncentrációnál váltotta csak ki. Az 1:1 arányú keverékek közül a nem-toxikus *terbuthylazine mesotrione*-nal kombinálva váltotta ki a legnagyobb toxikus hatást (EC₅₀= 30 mg/L). Továbbá, ez több, mint tízszer toxikusabbnak bizonyult, mint az *S-metolachlor*-ral kombinálva (EC₅₀= 376 mg/L) (**17. ábra**).

A krónikus AVF tesztben a tesztorganizmus a 10 és 15 órás expozíciós időnél bizonyult a legérzékenyebbnek és legmegbízhatóbbnak, ezért ezeknél a kontaktidőknél adtam meg az 50%-os gátlást kiváltó effektív koncentráció értékeket. A nem-lineáris regressziós analízis alapján

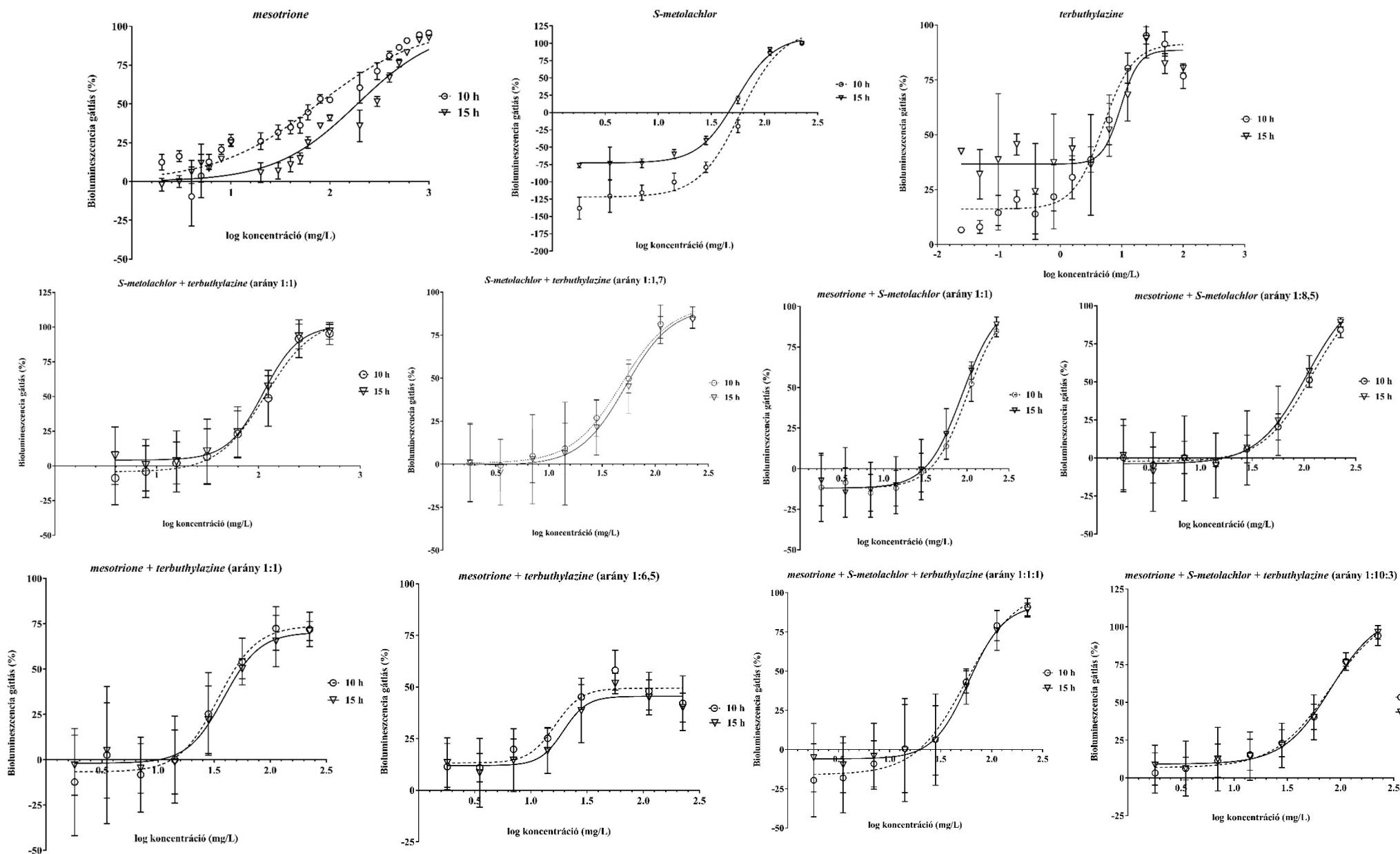
kapott EC_{50} értékeket és a hozzájuk tartozó kiegészítő adatokat (95%-os konfidencia intervallum, R^2 értékek) a **7. táblázat** tartalmazza, valamint a koncentráció-válasz görbéket az **17. ábra** mutatja be. Az *S-metolachlor* krónikus toxicitása egy nagyságrenddel nagyobb volt ($EC_{50, 10óra} = 59,2$ mg/L, $EC_{50, 15óra} = 54,0$ mg/L), mint az akut teszténél mért ($EC_{50, 30perc} = 265$ mg/L), míg a *mesotrione* toxicitásában nincs szignifikáns különbség ($EC_{50, 10óra} = 75,9$ mg/L, $EC_{50, 15óra} = 189,2$ mg/L) összehasonlítva az akut teszt eredményeivel ($EC_{50, 30perc} = 118$ mg/L). Az *S-metolachlor*-hoz hasonlóan az *AVF* látványosan megnövekedett érzékenységet mutatott a *terbuthylazine* esetében is ($EC_{50, 10óra} = 4,9$ mg/L és $EC_{50, 15óra} = 9,6$ mg/L). A krónikus *AVF* tesztben a *terbuthylazine* mutatta a legerősebb toxikus hatást a tesztorganizmusra nézve: még a legalacsonyabb koncentrációkban is szignifikáns fénykibocsátás csökkenést okozott az oldószeres kontrollhoz képest. Ezzel szemben az akut tesztben nem tudtam gátló hatást detektálni még a legmagasabb alkalmazott koncentrációnál (100 mg/L) sem. A készítmények alapján elkészített keverékek közül három (Gardoprim Plus Gold[®] [*S-metolachlor* + *terbuthylazine*], Calaris Pro[®] [*mesotrione* + *terbuthylazine*] és Lumax[®] [*mesotrione* + *S-metolachlor* + *terbuthylazine*]) a krónikus tesztben egy nagyságrenddel potensebbnek bizonyult, mint a rövidtávú, Microtox[®] tesztben. Az említett három készítmény közös komponense a *terbuthylazine* – megfigyelve az önálló toxicitását – toxicitás-erősítő hatása feltételezhető. Összehasonlítva az akut teszttel, a *mesotrione* + *terbuthylazine* (1:6,5 arányú) és az *S-metolachlor* + *terbuthylazine* (1:1,7 arányú) keveréke tízszer toxikusabbnak bizonyult a krónikus vizsgálatban, ahol az EC_{50} értékek 16,40 és 19,45 mg/L (a legtoxikusabb kombináció) voltak, illetve 48,1 és 52,4 mg/L 10, illetve 15 óránál. Az akut teszttel ellentétben krónikus expozíció során a készítményekben feltüntetett hatóanyag arányok szerinti és az azonos koncentrációban elegyített keverékek között nem állapítható meg szignifikáns, nagyságrendi toxicitásbeli különbség.

7. táblázat: Az akut (30 percnél) és a krónikus (10 és 15 óránál) *AVF* tesztek EC_{50} értékei (mg/L) szakirodalmi adatokkal összehasonlítva.

Aktív hatóanyagok és a belőlük képzett keverékek	EC_{50} értékek (mg/L) a krónikus <i>AVF</i> tesztekben (95%-os konfidencia intervallum) és R^2 értékek		EC_{50} értékek (mg/L) az akut <i>AVF</i> citotoxicitási tesztekben (95%-os konfidencia intervallum)	
	10 óra	15 óra	Saját mérés	Szakirodalmi adat
<i>mesotrione</i>	75,9 (64,21 - 89,64) R^2 : 0,917	189,2 (161,7 - 221,3) R^2 : 0,906	118 (76 - 180)	43,6 ± 2,4 ^d (15 perc); 398,66 ^f
<i>S-metolachlor</i> (* <i>metolachlor</i>)	59,2 (52,36 - 69,02) R^2 : 0,924	54,0 (49,08 - 61,50) R^2 : 0,935	265 (190 - 370)	17 ^a (* <i>metolachlor</i>); 214,85 ^c ; 178,4 ± 22,8 (15 perc) ^e ; 215,3 ^f
<i>terbuthylazine</i>	4,9 (4,03 - 6,10) R^2 : 0,920	9,6 (6,57 - 14,07) R^2 : 0,679	n.t. (-)	41,07 (15 perc) ^b ; n.a. ^f
<i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1)	117,2 (83,78 - 163,9) R^2 : 0,843	111,7 (87,34 - 142,8) R^2 : 0,835	376* (168 - 838)	n.a.
<i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ¹ 1,7:1)	48,1 (34,25 - 67,68) R^2 : 0,851	52,4 (33,46 - 82,20) R^2 : 0,740	450* (84 - 2380)	n.a.
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> (arány 1:1)	100,7 (63,85 - 158,8) R^2 : 0,870	87,2 (57,53 - 132,3) R^2 : 0,868	50 (38 - 66)	14,4 ± 0,8 (15 perc) ^g
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> (arány ² 1:8,5)	112,3 (68,85 - 183,2) R^2 : 0,880	102,9 (46,44 - 227,9) R^2 : 0,717	182 (86 - 386)	n.a.
<i>mesotrione</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1)	34,2 (22,40 - 52,33) R^2 : 0,686	38,5 (28,01 - 53,01) R^2 : 0,780	30 (24 - 34)	n.a.
<i>mesotrione</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ³ 1:6,5)	16,4 (12,55 - 21,38) R^2 : 0,738	19,5 (13,44 - 28,16) R^2 : 0,612	212 (86 - 512)	n.a.
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1:1)	55,5 (34,60 - 89,23) R^2 : 0,819	59,5 (41,12 - 84,12) R^2 : 0,790	56 (46 - 68)	n.a.
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ⁴ 1:10:3)	79,8 (54,78 - 116,4) R^2 : 0,920	81,0 (51,82 - 126,8) R^2 : 0,837	136 (44 - 410)	n.a.

Jelmagyarázat: ¹: Gardoprim Plus Gold® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 312 g/L *S-metolachlor*, 187 g/L *terbuthylazine*); ²: Camix® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 60 g/L *mesotrione*, 500 g/L *S-metolachlor*); ³: Calaris Pro® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 50 g/L *mesotrione*, 326 g/L *terbuthylazine*); ⁴: Lumax® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 37,5 g/L *mesotrione*, 375 g/L *S-metolachlor*, 125 g/L *terbuthylazine*); ^a KÖCK *et al.* 2010 ^b VILLA *et al.* 2012 ^c OSANO *et al.* 2002 ^d BONNET *et al.* 2008 ^e JOLY *et al.* 2013 ^f TERRATOX™ AQUA, Pesticides and *Vibrio fischeri* (*Vibrio*) adatbázis ^g CARLES *et al.* 2018; n.t.: nem toxikus - toxikus hatást (biolumineszcencia gátlás) nem detektáltunk a tesztelt koncentrációknál; n.a.: nincs adat; n = 5 az akut teszténél, n = 3 a krónikus teszténél; *: EC_{50} érték extrapolált adatokból lett kalkulálva.

17. ábra: Az aktív herbicid hatóanyagok és keverékeik koncentráció-válasz görbéi 10 és 15 óránál a krónikus *AVF* testben. A biolumineszcencia gátlási adatokat átlag ± szórás (SD) fejeztem ki a kontrollhoz képest (0%).



ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY

I. tézis: A *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* herbicid hatóanyagok különböző arányú kombinációinak először állapítottam meg az akut (30 perc) és krónikus (10 és 15 óra) effektív koncentráció értékeit az *Aliivibrio fischeri* tesztszervezetre nézve (kivételt képezi a *mesotrione* + *S-metolachlor* 1:1 arányú keveréke az akut Microtox[®] tesztet alkalmazva). Az *Aliivibrio fischeri* tesztszervezet a krónikus tesztben 10 és 15 órás kontaktidőknél bizonyult a legérzékenyebbnek, amelyben a tiszta hatóanyagok közül a *terbuthylazine* (EC_{50} 10 és 15 óra = 4,9 és 9,6 mg/L), a keverékek közül a *mesotrione* + *terbuthylazine* Calaris Pro[®] készítmény szerinti keveréke (EC_{50} 10 és 15 óra = 16,4 és 19,5 mg/L) váltotta ki a legnagyobb toxikus hatást. A *terbuthylazine* mellett *mesotrione*-t és *S-metolachlor*-t tartalmazó három készítmény szerinti keverék krónikus tesztben kapott EC_{50} értéke az akut teszthez képest egy nagyságrenddel kisebb volt. A prokarióta tesztorganizmust alkalmazó krónikus teszt önálló ellenőrző/értékelő vizsgálati módszerként alkalmas keverékhatások megállapítására.

Az I. tézis eredményeit az alábbi közleményben írtam le:

TÓTH, G., HÁHN, J., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2019): Acute and chronic toxicity of herbicides and their mixtures measured by *Aliivibrio fischeri* ecotoxicological assay.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 185, 109702.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109702> IF=4,872; Q1.

5.1.2 Herbicid hatóanyag keverékek szinergista, additív, antagonistá hatásaik megállapítása a KIM-mel

5.1.2.1 Akut AVF teszt

A KIM-mel meghatározott herbicidek együttes, akut toxicitásának eredményeit a **8. táblázat** foglalja össze, a KI értékekkel, az értékeket besoroló osztályokkal és koncentráció-válasz görbe paraméterekkel (m, r). 30 perces expozíció után az összes keverék szinergista hatást mutatott 0,12 - 0,77 közötti KI értékekkel (EC_{50}), erős vagy mérsékelt szinergizmust jelezve. A *terbuthylazine*-t tartalmazó keverékek erős szinergizmusa feltételezhetően nem csak az önmagában nem-toxikus vegyület hatásainak köszönhető. A *mesotrione* és a *terbuthylazine* (1:1 arányú) kombinált, akut toxicitása (EC_{50} = 30 mg/L) által eredményezett szinergista hatása a legnagyobb az összes vizsgált vegyület keverék közül. Az EC_{90} -nél meghatározott KI értékek

közül az *S-metolachlor* + *terbuthylazine* keveréknek két kombinációja (1:1 és 1:1,7) és a *mesotrione* + *terbuthylazine* (1:6,5 arányú) kombinációja mutatott erős, illetve mérsékelt antagonistát. A *mesotrione*-t ugyanolyan arányban *S-metolachlor*-ral keverve erős szinergizmust [figyelemre méltó KI értékkel (0,12) még alacsony koncentrációknál is (EC₁₀ és EC₂₀)], míg az 1:8,5 arányúnál antagonistát és additív választ állapítottam meg. Ezen hatások mellett az EC₁₀ KI értékeket nem lehetett kiszámítani (NaN – nem egy szám) a *terbuthylazine* koncentráció-válasz görbéjének hiánya miatt (az akut vizsgálatban toxikus hatást nem detektáltam a vizsgált koncentrációknál).

5.1.2.2 Krónikus AVF teszt

A herbicid hatóanyag keverékek (*mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*) krónikus toxicitási adatainak elemzése után megállapítottam a KI értékeket, a hozzájuk rendelhető KI osztályokat és a koncentráció-válasz görbe paramétereit (m, r), amelyeket a **9. táblázat** foglal össze. A *mesotrione* + *S-metolachlor* (1:1) keverékét additív/szinergista (ADD/SYN) hatások jellemezték 10 (EC₅₀ - 1,00 KI érték; EC₈₀ - 0,76 KI érték; EC₉₀ - 0,71 KI érték) és 15 órás (EC₂₀ - 0,95 KI érték; EC₅₀ - 0,88 KI érték; EC₈₀ - 0,88 KI érték; EC₉₀ - 0,97 KI érték) expozíciónál. Az összes többi keverék, kombináció esetében a KIM antagonistát (ANT) válaszokat tárt fel mindkét vizsgált kontaktidőnél (10 és 15 óra), mérsékelttől (KI > 1,20) a nagyon erős (> 10) antagonizmusig. Az *S-metolachlor* + *terbuthylazine* (1:1) keveréknek nagyon erős antagonistát hatása volt 10 órás expozíciós időnél a krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben.

8. táblázat: A három herbicid hatóanyag (*mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*) azonos arányú (1:1; 1:1:1) és a készítmények arányai szerinti keverékeknek a KI értékei és osztályozásuk 30 perces expozíciós időnél.

Herbicidek keverékei	Akut AVF 30 perc											
	EC ₁₀		EC ₂₀		EC ₅₀		EC ₈₀		EC ₉₀		m	r
	KI érték	Osztály	KI érték	Osztály	KI érték	Osztály	KI érték	Osztály	KI érték	Osztály		
<i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1)	NaN	-	NaN	-	0,70	SYN	2,09	ANT	3,96	ANT	0,66 ± 0,002	0,999
<i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ¹ 1,7:1)	NaN	-	NaN	-	0,62	SYN	0,97	SYN	1,25	ANT	0,96 ± 0,003	0,999
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> (arány 1:1)	0,12	SYN	0,16	SYN	0,27	SYN	0,45	SYN	0,61	SYN	1,01 ± 0,13	0,983
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> (arány ² 1:8,5)	1,24	ANT	1,04	ADD	0,77	SYN	0,58	SYN	0,49	SYN	2,09 ± 0,003	1,000
<i>mesotrione</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1)	NaN	-	NaN	-	0,12	SYN	0,17	SYN	0,21	SYN	1,18 ± 0,06	0,996
<i>mesotrione</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ³ 1:6,5)	NaN	-	NaN	-	0,23	SYN	1,00	ADD	2,31	ANT	0,61 ± 0,001	0,999
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1:1)	NaN	-	NaN	-	0,22	SYN	0,26	SYN	0,28	SYN	1,39 ± 0,02	0,999
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ⁴ 1:10:3)	NaN	-	NaN	-	0,44	SYN	0,65	SYN	0,82	SYN	1,03 ± 0,005	0,999

Jelmagyarázat: ¹: Gardoprim Plus Gold® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 312 g/L *S-metolachlor*, 187 g/L *terbuthylazine*); ²: Camix® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG – 60 g/L *mesotrione*, 500 g/L *S-metolachlor*); ³: Calaris Pro® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG – 50 g/L *mesotrione*, 326 g/L *terbuthylazine*); ⁴: Lumax® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG – 37,5 g/L *mesotrione*, 375 g/L *S-metolachlor*, 125 g/L *terbuthylazine*); NaN – nem egy szám (az értékek nem számíthatók); n = 5; m – meghatározza a koncentráció-válasz görbe alakjának koefficiensét: m = 1 hiperbolikus koncentráció-válasz görbét jelez, m > 1 szigmoidális koncentráció-válasz görbét jelez, m < 1 negatív szigmoidális koncentráció-válasz görbét jelez; r – tömeghatás törvényének egyezése (regressziós koefficiens); EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀, EC₈₀, EC₉₀ azok a hatásos koncentrációk, amelyek 10%, 20%, 50%, 80% és 90% gátlást eredményeztek az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcenciájában; ADD – additív hatás; ANT – antagonizmus; SYN – szinergizmus

9. táblázat: A három herbicid hatóanyag (*mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*) azonos arányú (1:1; 1:1:1) és a készítmények arányai szerinti keverékeknek a KI értékei és osztályozásuk 10 és 15 órás expozíció időnél.

Herbicid hatóanyagok keverékei	Krónikus <i>AVF</i>																							
	10 óra										m	r	15 óra										m	r
	EC ₁₀		EC ₂₀		EC ₅₀		EC ₈₀		EC ₉₀				EC ₁₀		EC ₂₀		EC ₅₀		EC ₈₀		EC ₉₀			
	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.	KI érték	Oszt.		
<i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1)	13,1	ANT	12,9	ANT	12,8	ANT	12,6	ANT	12,5	ANT	1,85 ± 1,18E-4	1,000	6,33	ANT	6,8	ANT	6,48	ANT	6,57	ANT	6,63	ANT	2,45 ± 9,17E-5	1,000
<i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ¹ 1,7:1)	6,66	ANT	6,56	ANT	6,41	ANT	6,26	ANT	6,18	ANT	1,86 ± 5,94E-4	1,000	2,73	ANT	3,08	ANT	3,79	ANT	4,66	ANT	5,26	ANT	2,01 ± 4,18E-4	1,000
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> (arány ¹ 1:1)	7,08	ANT	2,66	ANT	1,00	ADD	0,76	SYN	0,71	SYN	2,07 ± 6,90E-05	1,000	1,13	ANT	0,95	SYN	0,88	SYN	0,92	SYN	0,97	SYN	2,04 ± 1,97E-4	1,000
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> (arány ² 1:8,5)	2,82	ANT	1,98	ANT	1,81	ANT	1,97	ANT	2,10	ANT	1,87 ± 0,02	0,999	1,39	ANT	1,49	ANT	1,76	ANT	2,11	ANT	2,36	ANT	1,83 ± 0,01	0,999
<i>mesotrione</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1)	7,44	ANT	5,01	ANT	3,52	ANT	2,77	ANT	2,42	ANT	2,51 ± 0,001	1,000	2,14	ANT	2,04	ANT	2,03	ANT	2,09	ANT	2,13	ANT	2,69 ± 9,42E-4	1,000
<i>mesotrione</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ³ 1:6,5)	5,81	ANT	4,37	ANT	2,88	ANT	1,92	ANT	1,52	ANT	1,78 ± 0,005	0,999	2,23	ANT	2,03	ANT	1,75	ANT	1,52	ANT	1,40	ANT	4,14 ± 0,007	1,000
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány 1:1:1)	5,78	ANT	4,55	ANT	4,13	ANT	4,17	ANT	4,23	ANT	1,75 ± 5,50E-4	1,000	2,43	ANT	2,39	ANT	2,46	ANT	2,61	ANT	2,71	ANT	2,49 ± 2,79E-4	1,000
<i>mesotrione</i> + <i>S-metolachlor</i> + <i>terbuthylazine</i> (arány ⁴ 1:10:3)	4,39	ANT	4,22	ANT	4,44	ANT	4,85	ANT	5,12	ANT	1,66 ± 1,23E-5	1,000	2,12	ANT	2,36	ANT	2,88	ANT	3,55	ANT	4,02	ANT	1,92 ± 2,88E-4	1,000

Jelmagyarázat: ¹: Gardoprim Plus Gold® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 312 g/L *S-metolachlor*, 187 g/L *terbuthylazine*); ²: Camix® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 60 g/L *mesotrione*, 500 g/L *S-metolachlor*); ³: Calaris Pro® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 50 g/L *mesotrione*, 326 g/L *terbuthylazine*); ⁴: Lumax® készítmény hatóanyag tartalma alapján (Syngenta AG - 37,5 g/L *mesotrione*, 375 g/L *S-metolachlor*, 125 g/L *terbuthylazine*); n = 3; m – meghatározza a koncentráció-válasz görbe alakjának koefficiensét: m = 1 hiperbolikus koncentráció-válasz görbét jelez, m > 1 szigmoidális koncentráció-válasz görbét jelez, m < 1 negatív szigmoidális koncentráció-válasz görbét jelez; r – tömeghatás törvényének egyezése (regressziós koefficiens); EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀, EC₈₀, EC₉₀ azok a hatásos koncentrációk, amelyek 10%, 20%, 50%, 80% és 90% gátlást eredményeztek az *Alivibrio fischeri* biolumineszcenciájában; ADD – additív hatás; ANT – antagonizmus; SYN – szinergizmus

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY

II. tézis: A Kombinációs Index Módszer segítségével elsőként állapítottam meg a *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* különböző arányú keverékeinek komponensei között fellépő antagonista, additív és szinergista hatásokat az egyes hatásos koncentrációszinteken akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben. Az akut tesztben 50%-os toxikus koncentráción (EC₅₀) az összes keverék esetében szinergia volt detektálható. Az azonos arányú (1:1) *mesotrione* és *S-metolachlor* keverék akut tesztben minden hatásos koncentráción (még EC₁₀-nél is = 5,1 mg/L), míg a krónikus tesztben (10 és 15 órás kontaktidőnél) EC₅₀, EC₈₀, EC₉₀ értékeken additív és szinergista hatást mutatott. A krónikus tesztben a többi keverék minden hatásos koncentráción antagonista választ eredményezett.

A II. tézis eredményeit az alábbi közleményben írtam le:

TÓTH, G., HÁHN, J., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2019): Acute and chronic toxicity of herbicides and their mixtures measured by *Aliivibrio fischeri* ecotoxicological assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185, 109702.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109702> IF=4,872; Q1.

5.1.3 Akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* citotoxicitási tesztek [glyphosate, AMPA, POE(15), glyphosate-tartalmú készítmények (13)]

Az *Aliivibrio fischeri* tesztek által mért citotoxicitást EC₅₀ értékekben fejeztem ki. A jobb és könnyebb összehasonlítás érdekében a *glyphosate*-alapú készítmények effektív koncentráció értékeit *glyphosate*-só és *glyphosate*-sav formájában is megadtam.

Az *AVF* biolumineszcencia-gátlásával mért akut (30 perc) és krónikus (10 és 15 óra) citotoxicitási eredményeket (EC₅₀ értékek, 95%-os konfidencia intervallum, R² értékek) 30 perc, valamint 10, illetve 15 órás expozíció után az AMPA, *glyphosate*, POE(15), IPA-, DMA-, P-, AM-, DIAM-sókkal rendelkező *glyphosate*-tartalmú készítmények esetében az **10. táblázat** mutatja be. A nem-lineáris regresszió analízisből származó koncentráció-válasz görbék az **18. és 19. ábrán** láthatók, ahol a készítményekben megtalálható formázó-, segédanyagokat a biztonságtechnikai adatlapjuk (MSDS - Material Safety Data Sheet) alapján feltüntettem. A tiszta vegyületek közül a *glyphosate* és az AMPA, 30 perc expozíció után még a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (azaz oldhatósági határuknál) sem okozták a teszt szerkezet

fénykibocsátás gátlását. Másfelől, az AMPA és a POE(15) esetében a legalacsonyabb koncentrációknál a biolumineszcencia enyhe növekedése volt megfigyelhető, ami magyarázatot adhat a hormézisz jelensége, vagyis bizonyos toxikus vegyületek alacsony dózis/koncentráció esetén stimuláló/kedvező hatásokat eredményezhetnek (MATTSON 2008). A POE(15) akut toxikus hatást gyakorolt az *AVF*-re, az EC_{50} értéke 19,3 mg/L volt. A *glyphosate*-alapú herbicidek közül legnagyobb toxikus hatást a Glialka Express 6H[®] (IPA-só tartalmú; hígíthatlanul, felhasználásra kész készítmény) fejtette ki, ahol az EC_{50} értékek 3,8 és 3 mg/L voltak a *glyphosate* IPA-sóra és *glyphosate*-savra megállapítva. A Glialka Express 6H[®]-t a Roundup[®] Classic (EC_{50} IPA-só, G-sav= 54,7 és 40,5 mg/L), Total[®] (EC_{50} IPA-só, G-sav= 73 és 54 mg/L), Roundup[®] Mega (EC_{50} P-só, G-sav= 82,7 és 67,5 mg/L), Medallon Premium[®] (EC_{50} DIAM-só, G-sav= 88 és 72 mg/L) és Glialka Star[®] (EC_{50} P-só, G-sav= 88,2 és 72 mg/L) követte. A Roundup[®] Mega és a Glialka Star[®] toxicitása szinte megegyezett az összetételük (G-só és a segédanyagok) miatt. A többi készítmény kevésbé volt toxikus az *Aliivibrio fischeri*-re nézve az akut tesztben: az EC_{50} értékek egy nagyságrenddel nagyobbak voltak, 144 mg/L-től (108 mg/L G-savra vonatkoztatva) 606 (445 mg/L G-savra vonatkoztatva) mg/L-ig.

A krónikus vizsgálatot illetően a POE(15) toxicitása hasonló volt az akut vizsgálat eredményeihez. A *glyphosate* és az AMPA, mint tiszta vegyületek szintén nem okoztak gátlást, ugyanúgy, mint az akut tesztben. A Glialka Express 6H[®] itt is a legtoxikusabb készítménynek bizonyult, EC_{50} értékei 3,9 és 1,2 mg/L volt, 10 és 15 órás expozíciónál. Ezt követte a Barclay Gallup Biograde 360[®] és a Medallon Premium[®], ahol az EC_{50} értékek szintén nagyon alacsonyak voltak: 4,5 és 39,3 mg/L 10 óra után, illetve 26,4 és 30,3 mg/L 15 óra után. Előkísérleteim és korábbi vizsgálataim során az *AVF* a legnagyobb érzékenységet 15 órás expozíciónál mutatta a krónikus tesztben és érzékenyebb volt a herbicidekre, mint az akut tesztben. A Glyfos Dakar[®] (EC_{50} 10h, 15h, AM-só= 87,8 és 626 mg/L), a Barclay Gallup Biograde 360[®] (EC_{50} 10h, 15h, IPA-só= 4,5 és 26,4 mg/L) és a Total[®] (EC_{50} 10h, 15 óra, IPA-só= 44 és 196 mg/L) készítményeknél az EC_{50} értékek 10 óránál alacsonyabbak voltak (nagyobb toxicitás), mint 15 óránál. A többi *glyphosate*-alapú készítmény toxicitása az expozíció időtartamával csökkent.

Összességében nem találtam összefüggést a citotoxicitás és készítményekben található *glyphosate*-só típusa között. Azonban a legtoxikusabb Glialka Express 6H[®] készítmény, amely legfeljebb 1 w/w% IPA-sót tartalmaz az egyetlen olyan készítmény, amelyben a pelargonsav és egyéb kapcsolódó zsírsavak formázó-, segédanyagokként megtalálhatóak. Következésképpen a

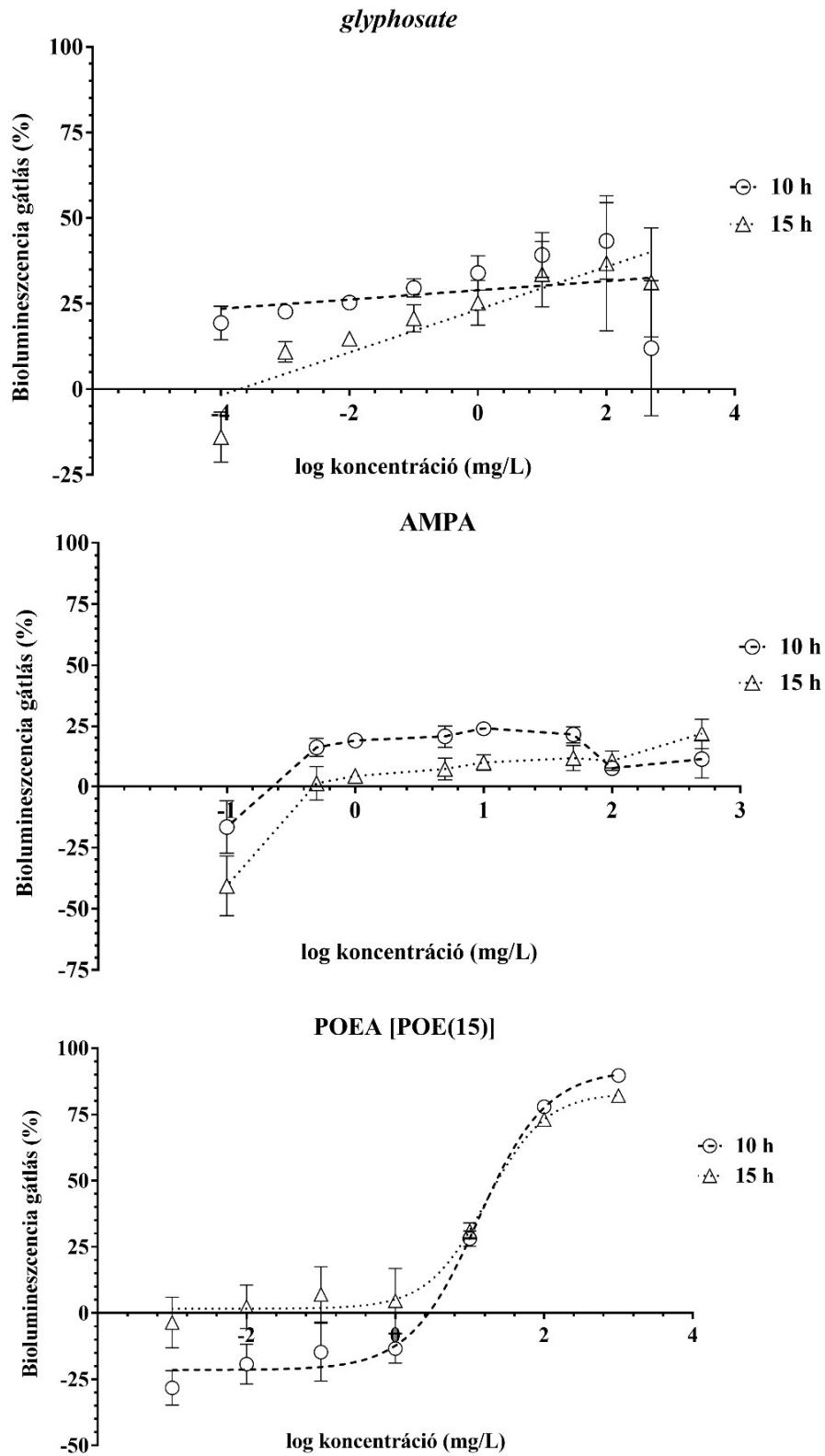
magas toxicitást valószínűsíthetően a segédanyagok okozzák, nem pedig a *glyphosate* IPA-só, amelyet más, vizsgálatba vont készítmények is tartalmaznak.

10. táblázat: Az akut (30 perc) és a krónikus (10 és 15 óra) *Aliivibrio fischeri* tesztek eredményei (EC₅₀ [mg/L]) a *glyphosate*, AMPA, POE(15) és 13 *glyphosate*-tartalmú készítményre vonatkozólag.

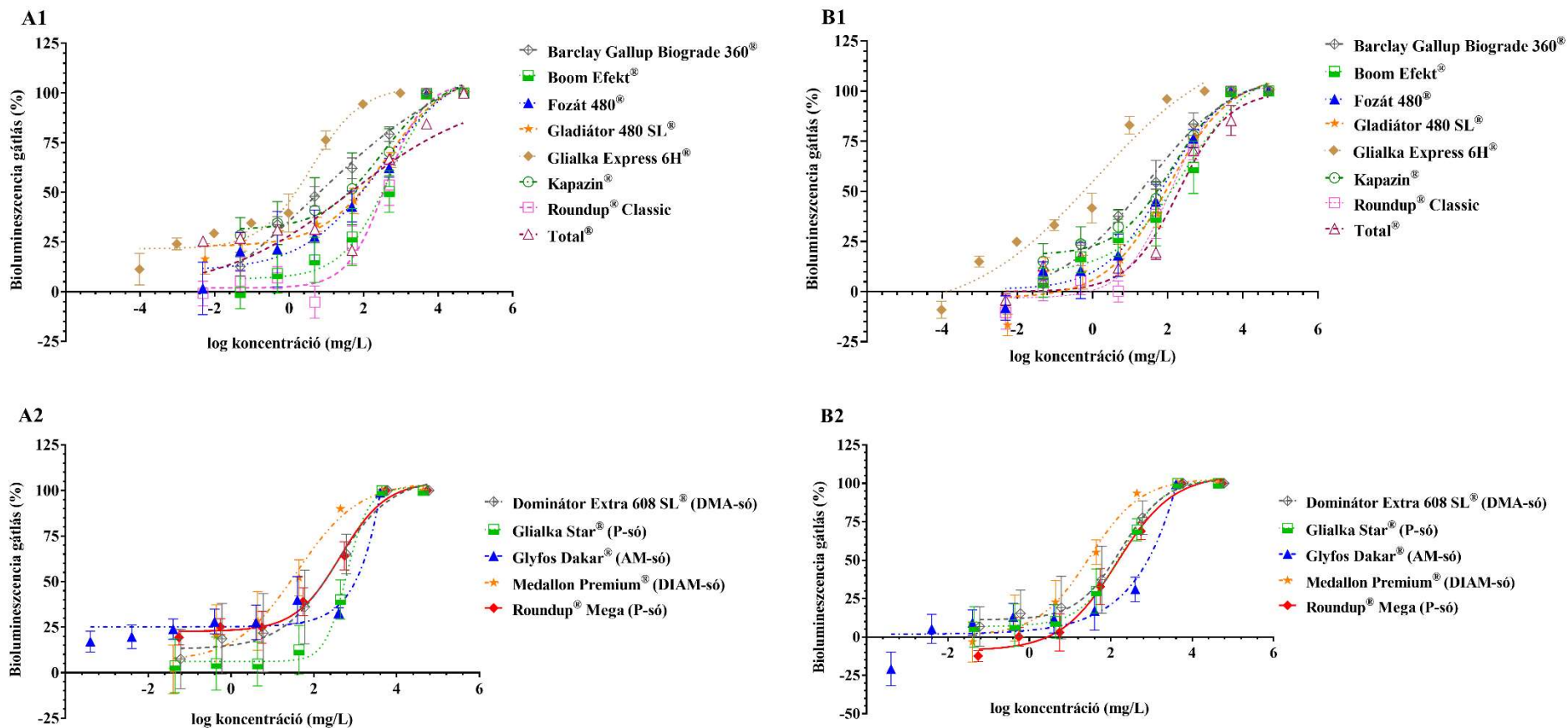
Tiszta vegyületek és készítmények	EC ₅₀ értékek (mg/L) az akut AVF citotoxicitási tesztekben (95%-os konfidencia intervallum)		EC ₅₀ értékek (mg/L) a krónikus AVF (95%-os konfidencia intervallum) citotoxicitási tesztekben és R ² értékek				Formázó-, segédanyagok a készítményekben az MSDS alapján
	30 perc		10 óra		15 óra		
	G-só	G-sav	G-só	G-sav	G-só	G-sav	
<i>glyphosate</i>	n.t.		n.m.*		n.m.*		-
AMPA	n.t.		n.m.**		n.m.**		-
POEA [POE(15)]	19,3		13 (10 – 17) R ² : 0,979		17 (11 – 25,7) R ² : 0,947		-
Barclay Gallup Biograde 360 ^{®1}	606 (559 – 655)	450	4,5 (0,22 – 93,4) R ² : 0,975	3,4	26,4 (12 – 58) R ² : 0,970	19,6	nem deklarált
Boom Efekt ^{®1}	600 (528 – 672)	450	499 (252 – 989) R ² : 0,933	374	297 (109 – 805) R ² : 0,928	222	foszfát észter aminosó (5-15%)
Fozát 480 ^{®1}	144 (144 – 168)	108	315 (67,9 – 1464) R ² : 0,900	237	83 (46,3 – 149) R ² : 0,957	62	nem deklarált
Gladiátor 480 SL ^{®1,6}	144 (144 – 192)	108	377 (197 – 720) R ² : 0,963	282	103 (55,7 – 192) R ² : 0,955	77,6	polietoxilált fattyúamin [POE(15)] (13-18%)
Glialka Express 6H ^{®1}	3,8 (2,9 – 4,8)	3	3,9 (2,3 – 6,8) R ² : 0,956	2,97	1,2 (0,25 – 6) R ² : 0,952	0,9	pelargonsav és zsírsavak (2%), más felületaktív anyag, ami nem deklarált (1,5%)
Kapazin ^{®1}	292 (292 – 316)	216	300 (87,9 – 1029) R ² : 0,860	223	130 (75,2 – 227) R ² : 0,957	96,7	C8-10 etoxilált alkohol (<2 g/L), trietilénlikol-monobutil-éter (<2 g/L)
Roundup [®] Classic ^{1,6}	54,7 (36,5 – 54,7)	40,5	393 (268 – 578) R ² : 0,961	291	119 (76,9 – 183) R ² : 0,964	87,7	polietoxilált fattyúamin [POE(15)] (15,5%)
Total ^{®1}	73 (73 – 73)	54	44 (15,5 – 125) R ² : 0,741	32,6	196 (136 – 283) R ² : 0,943	145	nem deklarált (inert összetevő)
Dominátor Extra 608 SL ^{®2}	159 (152 – 167)	126	344 (124 – 954) R ² : 0,858	271	179 (85,9 – 371) R ² : 0,890	141	D-glükopiranoz, oligomerek, decil-oktil-glikozidok (<5%), dinátrium kokoa-fodipropionát (<5%), metil-alkohol (<1%)
Glialka Star ^{®3}	88,2 (88,2 – 110)	72	623 (404 – 962) R ² : 0,938	509	190 (117 – 307) R ² : 0,945	155	etoxilált éter-alkilamin (6%)
Roundup [®] Mega ³	82,7 (82,7 – 82,7)	67,5	437 (291 – 655) R ² : 0,965	356	142 (92,3 – 218) R ² : 0,972	116	etoxilált éter-alkilamin (7%)
Glyfos Dakar ^{®4}	299 (299 – 299)	243	87,8 (21,4 – 361) R ² : 0,581	71,3	626 (411 – 954) R ² : 0,816	508	etoxilált hidrogénezett zsírsavamin (1-5%)
Medallon Premium ^{®5}	88 (66 – 88)	72	39,3 (18,4 – 84) R ² : 0,921	32,2	30,3 (17,7 – 51,9) R ² : 0,948	24,8	D-glükopiranoz, oligomerek, decil-oktil-glikozidok (10-20%)

Jelmagyarázat: G-só – *glyphosate*-só; G-sav – *glyphosate*-sav (G-só tartalomából számolva); n = 3 az akut tesztben (ISO 11348:2 szabvány szerint) és a krónikus tesztben; n.m.* - nem meghatározható; maximum gátlási értékek 43,3 és 36,8% voltak 100 mg/L koncentrációnál 10 és 15 órás expozíció után; n.m.** - nem meghatározható, maximum gátlási értékek 23,8% 10 órát követően és 21,7% 15 órát követően 10 és 50 mg/L koncentrációnál; ¹ – IPA-só; ² – DMA-só; ³ – P-só; ⁴ – AM-só; ⁵ – DIAM-só; ⁶ – POE(15)-t tartalmazó készítmény.

18. ábra: A tiszta vegyületek (*glyphosate*, AMPA, POEA [POE(15)]) krónikus citotoxikus hatásai az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási testben 10 és 15 órás expozíciónál mérve. A biolumineszcencia gátlási adatokat átlag \pm szórás (SD) fejeztem ki a kontrollhoz képest (0%).



19. ábra: A *glyphosate*-alapú készítmények krónikus citotoxikus hatásai az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási tesztben 10 órás (A1 és A2) és 15 órás (B1 és B2) expozíciónál mérve. A biolumineszcencia gátlási adatokat átlag \pm szórás (SD) fejeztem ki a kontrollhoz képest (0%). A1 és B1 – *glyphosate* IPA-sót tartalmazó készítmények (Barclay Gallup Biograde 360[®], Boom Efekt[®], Fozát 480[®], Gladiátor 480 SL[®], Glialka Express 6H[®], Kapazin[®], Roundup[®] Classic, Total[®]); A2 és B2 – *glyphosate* DMA-sót, P-sót, AM-sót, DIAM-sót tartalmazó készítmények (Dominátor Extra 608 SL[®], Glialka Star[®], Glyfos Dakar[®], Medallon Premium[®], Roundup[®] Mega).



ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY

III. tézis: A *glyphosate*, az AMPA, a POE(15) tiszta vegyületek és 13 *glyphosate*-alapú herbicid készítmény esetében először írtam le az *Aliivibrio fischeri* ökotoxikológiai tesztorganizmusra gyakorolt krónikus, valamint 12 készítmény (kivéve Roundup® Classic) által kiváltott akut citotoxikus hatást. Az akut és krónikus tesztben a *glyphosate*-sav és az AMPA metabolit a legnagyobb alkalmazott koncentrációnál (5 g/L) nem bizonyult toxikusnak. Ezzel szemben a 11 készítmény 44-623 mg/L közötti koncentrációkban 50%-os toxikus hatást fejtett ki a rövid- és hosszú távú tesztekben. *Glyphosate*-só tartalomra számítva a felhasználásra kész Glialka Express 6H® (EC₅₀ 10 és 15 óra = 3,9 mg/L és 1,2 mg/L) és a nem deklarált formázó-, segédanyag tartalmú Barclay Gallup Biograde 360® (EC₅₀ 10 és 15 óra = 4,5 mg/L és 26,4 mg/L) bizonyult a két legtoxikusabb *glyphosate*-alapú készítménynek. A citotoxikus hatások és a készítményekben található *glyphosate*-só típusok között nem volt kimutatható összefüggés.

Az III. tézis eredményeit az alábbi közleményben írtam le:

TÓTH, G., HÁHN, J., RADÓ, J., SZALAI, D., A., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2020): Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environmental Pollution*, 265, 115027. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115027> IF=8,07; Q1, D1.

5.1.4 Hormonális aktivitás és sejtoxikus hatások vizsgálata Saccharomyces cerevisiae alapú bioriporterekkel (BLYAS, BLYES, BLYR)

A direkt ösztrogén és androgén aktivitást *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsekkel mértem a vizsgálataimban.

A *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine* hatóanyagok közül egyik vegyület sem idézett elő fénykibocsátást a BLYAS és BLYES bioriporterekben a vizsgálati koncentráció tartományokban. Így megállapítható, hogy nincs direkt hormonhatása egyik hatóanyagoknak sem, azaz közvetlenül nem kötődnek a humán ösztrogén-, vagy androgén receptorokhoz. Ezek alapján a belőlük képzett hatóanyag keverékeket nem vittem további vizsgálatokba.

A pozitív kontroll vegyületek EC₅₀ értékei (átlagértékekkel és szórással feltüntetve független bioriporter tesztekben) E2 esetében 5,93E-10 ± 3,5E+00 M, a DHT esetében 1,79E-08 ± 1,13E+01 M voltak. A közvetlen ösztrogén és androgén aktivitás mérésének validálási kritériumai megfelelőek voltak és eleget tettek az elvárt szakirodalmi EC₅₀ értékeknek, amelyek a BLYES és BLYAS tesztekben pozitív kontroll vegyületekként alkalmazott E2 esetében 6,3E-

$10 \pm 2,4E-01$ M, a DHT vonatkozásában pedig $1,1E-08 \pm 0,5E-05$ M (SANSEVERINO *et al.* 2009). A metanol (MeOH), mint negatív kontroll az E2 és a DHT esetében nem eredményezett változást a biolumineszcencia értékekben, összehasonlítva a vizsgált tesztorganizmus törzsén tesztelt vegyület nélküli értékével. Az anyagok által kiváltott potenciális sejttoxicitást a konstitutív, kontroll BLYR törzs alkalmazásával ellenőriztem. Az effektív koncentrációkat a készítményekben lévő *glyphosate*-sóra és *glyphosate*-savra vonatkoztatva is kifejeztem (**11. táblázat**), mint az **5.1.3 alfejezetben** leírt *AVF* vizsgálatoknál (**10. táblázat**). A három tiszta vegyület (*glyphosate*, AMPA és a POEA [POE(15)]), illetve az IPA-sóval és a DMA-, P-, AM-, DIAM-sókkal érintett *glyphosate*-alapú készítmények által kifejtett hatásokról koncentrációválasz görbéket készítettem, melyeken feltüntettem a mérési bizonytalanságokat (szórás) is az 5 órás kontaktidő alapján (**20., 21., 22. ábrák**).

A tesztelt készítmények sejttoxicitása befolyásolhatja a hormonális aktivitás kimutatásának eredményeit. Számos előkísérletet végeztem annak érdekében, hogy pontosan meg tudjam határozni, hogy az adott készítmény, vagy a tiszta vegyület hormonálisan aktív-e, citotoxikus-e, vagy esetleg mindkettő. Ha a készítmény citotoxikus volt a vizsgált koncentráció tartományban, akkor az esetlegesen kifejtett ED hatást egy, vagy két nagyságrenddel alacsonyabb koncentráció tartományban is megvizsgáltam. Az *AVF*-fel mért citotoxicitási eredményekhez hasonlóan, sem a *glyphosate*, sem az AMPA nem bizonyult toxikusnak a BLYR törzsrre és egyik sem rendelkezett hormonális aktivitással BLYAS, BLYES törzsek esetében. Ezzel szemben a POE(15) citotoxikus ($EC_{50} = 24$ mg/L) és ösztrogén hatásúnak ($EC_{50} = 13,4$ mg/L) bizonyult a BLYR és a BLYES tesztekben (**11. táblázat, 20. ábra**). A készítmények közül a Barclay Gallup Biograde 360[®] (IPA-só), a Kapazin[®] (IPA-só) és a Medallon Premium[®] (DIAM-só) egyik bioripporter törzs biolumineszcenciájában sem okozott változást. A Glialka Express 6H[®] az *AVF* vizsgálatokhoz hasonlóan, erős toxikus hatást gyakorolt *S. cerevisiae* BLYR törzsére, nagyon alacsony EC_{50} érték (4,5 mg/L) mellett. Ebben az esetben, az erőteljesen fellépő citotoxikus hatások miatt, a hormonális aktivitás nem volt mérhető a BLYES és a BLYAS segítségével. A Boom Efekt[®] enyhén toxikusnak bizonyult, viszont a nem-toxikus koncentrációkban sem ösztrogén, sem androgén hatást sem mutatott. A POE(15)-tel formázott Gladiátor 480 SL[®] és a Roundup[®] Classic mellett a más segédanyag összetételű Total[®] és Glialka Star[®] mérsékelt toxicitással bírt, továbbá mind a négy készítmény biolumineszcencia intenzifikációt eredményezett a BLYES törzsnél (**11. táblázat, 21. ábra**). A Glyphos Dakar[®] volt az egyetlen olyan készítmény, amelynek sem citotoxikus, sem ösztrogén hatása nem volt, de androgén

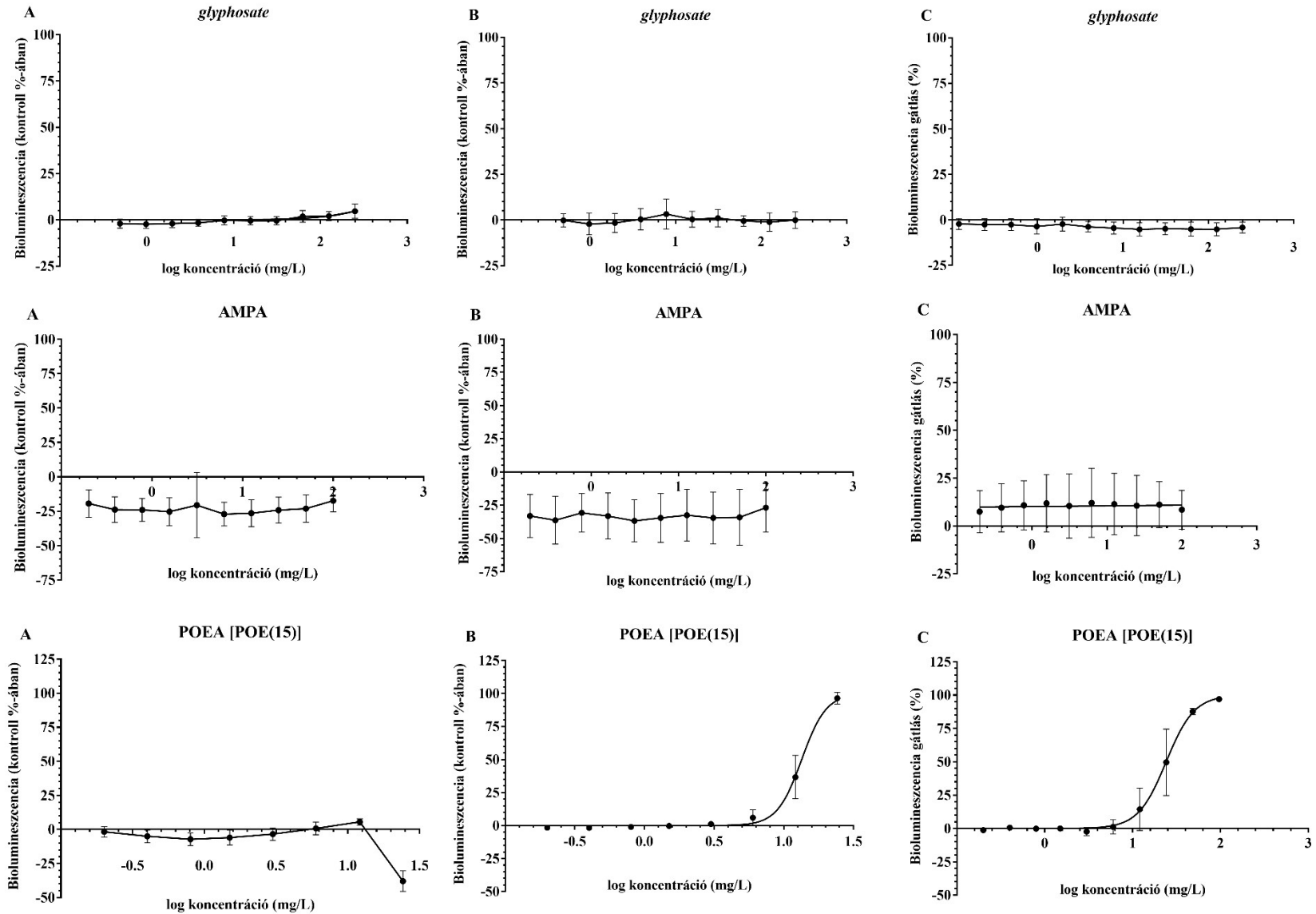
aktivitást mutatott ($EC_{50} = 22,4$ mg/L). A Fozát 480[®], a Dominátor Extra 608 SL[®] és a Roundup[®] Mega enyhén sejttoxikusnak bizonyultak, és nemcsak ösztrogén, hanem androgén aktivitással is rendelkeztek. Glyphos Dakar[®]-nál figyelembe véve a szórás értékeket és a koncentráció-válasz görbét a **22. ábrán**, a meglehetősen alacsony R^2 érték és a széles konfidencia intervallum ellenére (**11. táblázat**), a koncentráció-függő androgén hatás egyértelműen látszik. A biorporter tesztek eredményei szerint az ösztrogén és/vagy androgén hatások nem tulajdoníthatóak egyértelműen a *glyphosate*-só típusának. Mindazonáltal, az 1% *glyphosate*-IPA-sót, 2% pelargonsavat és más zsírsavakat, valamint 1,5% egyéb felületaktív anyagot tartalmazó (nem deklarált), hígíthatatlanul-felhasználásra kész Glialka Express 6H[®] citotoxikus hatással bírt a prokarióta *Aliivibrio fischeri* és az eukarióta *Saccharomyces cerevisiae*-re nézve, ami egyértelműen a segédanyagoknak volt tulajdonítható.

11. táblázat: Az ösztrogén és androgén aktivitási, valamint citotoxicitási eredmények 5 órás kontaktidőnél (EC₅₀ [mg/L]) a *glyphosate*, AMPA, POE(15) és 13 *glyphosate*-tartalmú készítmény esetében.

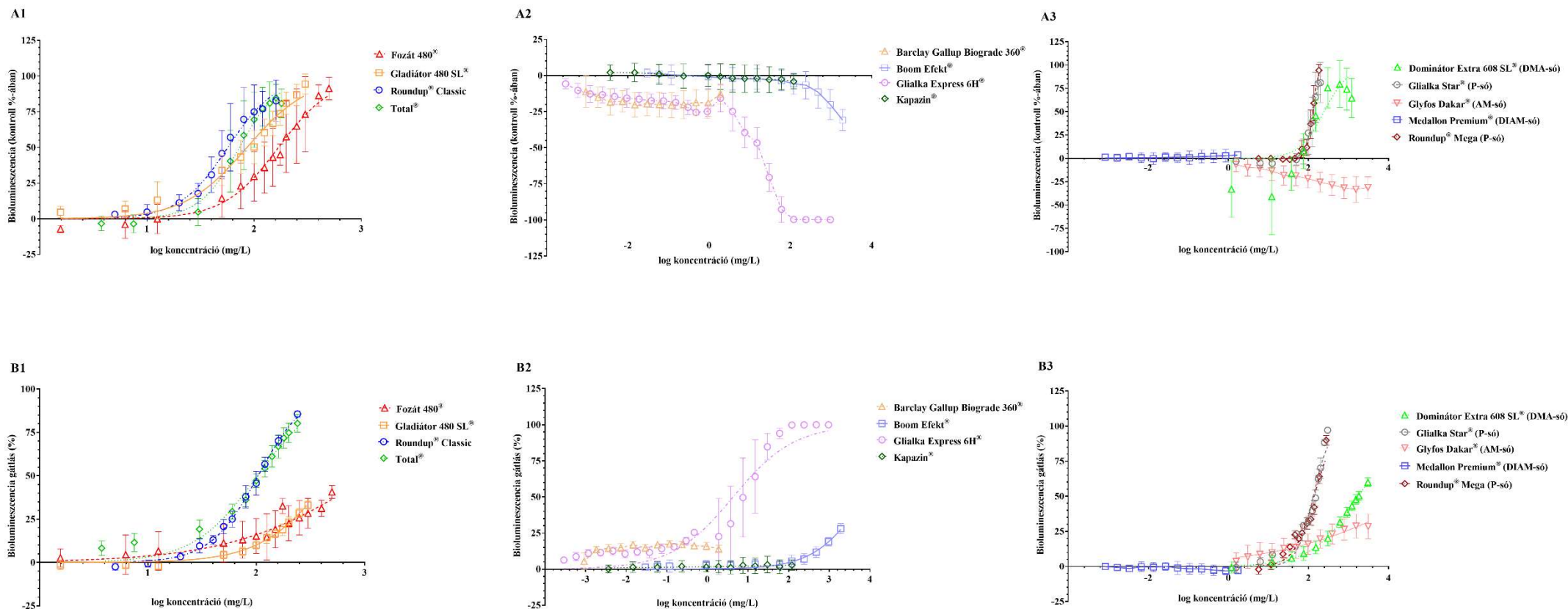
Tiszta vegyületek és készítmények	Ösztrogén és androgén aktivitás EC ₅₀ értékek (mg/L), (95%-os konfidencia intervallum) és R ² értékek				Citotoxicitás EC ₅₀ értékek (mg/L), (95%-os konfidencia intervallum) és R ² értékek		Formázó-, segédanyagok a készítményekben az MSDS alapján
	BLYES törzs 5 óra		BLYAS törzs 5 óra		BLYR törzs 5 óra		
	G-só	G-sav	G-só	G-sav	G-só	G-sav	
<i>glyphosate</i>	n.ö.a.		n.a.a.		n.t.		-
AMPA	n.ö.a.		n.a.a.		n.t.		-
POEA [POE(15)]	13,4 (12,8 – 14) R ² : 0,964		n.a.a.		24 (22 – 26,4) R ² : 0,945		-
Barclay Gallup Biograde 360 ^{®1}	n.ö.a.	n.ö.a.	n.a.a.	n.a.a.	n.t.	n.t.	nem deklarált
Boom Efekt ^{®1}	n.ö.a.	n.ö.a.	n.a.a.	n.a.a.	7629 (5567 – 10456) R ² : 0,823	5721	foszfát észter aminosó (5-15%)
Fozát 480 ^{®1}	169 (156 – 182) R ² : 0,731	127	52 (42,5 – 63,7) R ² : 0,781	39	1118 (771 – 1621) R ² : 0,451	839	nem deklarált
Gladiátor 480 SL ^{®1,6}	85,8 (79,1 – 93,1) R ² : 0,903	64,4	n.a.a.	n.a.a.	490 (454 – 530) R ² : 0,954	368	polietoxilált faggyúamin [POE(15)] (13-18%)
Glialka Express 6H ^{®1}	n.ö.a.	n.ö.a.	n.a.a.	n.a.a.	4,5 (3,4 – 5,9) R ² : 0,872	3,4	pelargonsav és zsírsavak (2%), más felületaktív anyag, ami nem deklarált (1,5%)
Kapazin ^{®1}	n.ö.a.	n.ö.a.	n.a.a.	n.a.a.	n.t.	n.t.	C8-10 etoxilált alkohol (<2 g/L), trietilénlikolmonobutil-éter (<2 g/L)
Roundup [®] Classic ^{1,6}	57,5 (52,8 – 62,5) R ² : 0,810	42,6	n.a.a.	n.a.a.	104 (102 – 107) R ² : 0,979	77	polietoxilált faggyúamin [POE(15)] (15,5%)
Total ^{®1}	72,8 (66,2 – 80,0) R ² : 0,848	53,9	n.a.a.	n.a.a.	103 (98,2 – 107) R ² : 0,931	76	nem deklarált (inert összetevő)
Dominátor Extra 608 SL ^{®2}	248 (163 – 379) R ² : 0,602	196	72,2 (46,3 – 113) R ² : 0,546	57	1758 (1647 – 1877) R ² : 0,962	1389	D-glükopiranoz, oligomerek, decil-oktil-glikozidok (<5%), dinátrium koko-amfodipropionát (<5%), metil-alkohol (<1%)
Glialka Star ^{®3}	132 (125 – 140) R ² : 0,810	108	n.a.a.	n.a.a.	132 (127 – 138) R ² : 0,935	108	etoxilált éter-alkilamin (6%)
Roundup [®] Mega ³	127 (123 – 130) R ² : 0,921	103	3,9 (2,1 – 7,5) R ² : 0,545	3,2	137 (130 – 145) R ² : 0,919	111	etoxilált éter-alkilamin (7%)
Glyfos Dakar ^{®4}	n.ö.a.	n.ö.a.	22,4 (7,7 – 65,5) R ² : 0,173	20,2	n.t.	n.t.	etoxilált hidrogénezett zsírsavamin (1-5%)
Medallon Premium ^{®5}	n.ö.a.	n.ö.a.	n.a.a.	n.a.a.	n.t.	n.t.	D-glükopiranoz, oligomerek, decil-oktil-glikozidok (10-20%)

Jelmagyarázat: G-só – *glyphosate*-só; G-sav – *glyphosate*-sav (G-só tartalomából számolva); ¹ – IPA-só; ² – DMA-só; ³ – P-só; ⁴ – AM-só; ⁵ – DIAM-só; ⁶ – POE(15)-t tartalmazó készítmény; n.ö.a.: nincs ösztrogén aktivitás (intenzifikáció a biolumineszcenciában) a tesztelt koncentrációknál; n.a.a.: nincs androgén aktivitás (intenzifikáció a biolumineszcenciában) a tesztelt koncentrációknál; n.t.: nem-toxikus – toxikus hatás (gátlás a biolumineszcenciában) nem volt a tesztelt koncentrációknál; n = 3 a BLYES/BLYAS/BLYR tesztekben 5 óránál.

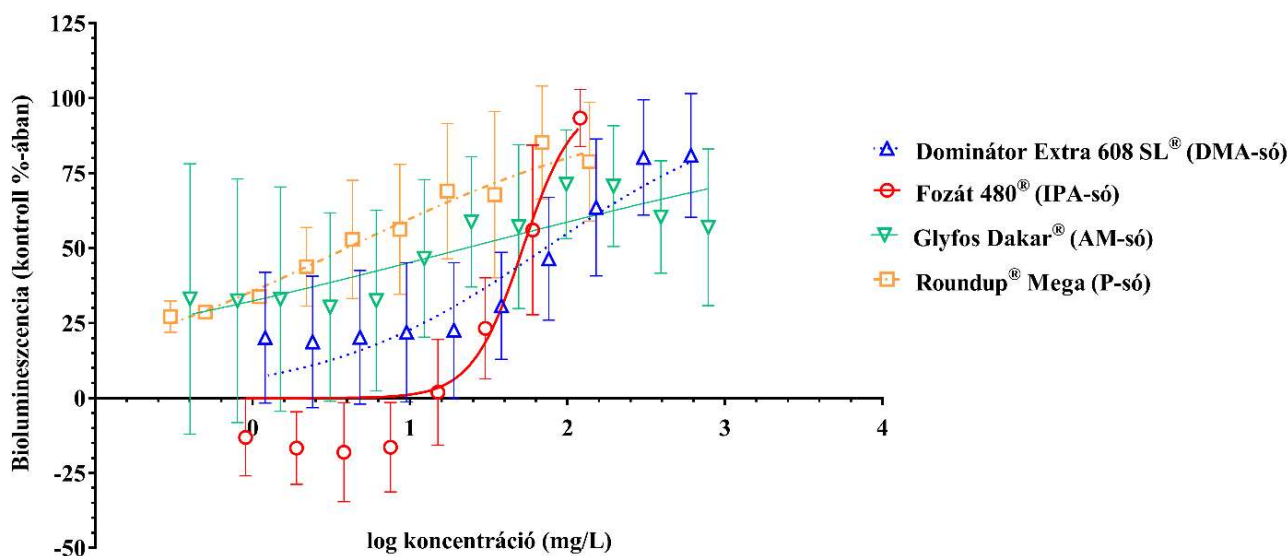
20. ábra: A *glyphosate*, AMPA, POEA [POE(15)] androgén, ösztrogén és sejttoxikus hatásai az *S. cerevisiae* alapú biolumineszcencia biorporter tesztekkel mérve a BLYAS (A), BLYES (B) és BLYR (C) törzsekkel 5 órás kontaktidőnél. A biolumineszcencia adatokat átlag \pm szórás (SD) értékekkel fejeztem ki a kontroll százalékában.



21. ábra: Az IPA-sót tartalmazó *glyphosate*-alapú (Barclay Gallup Biograde 360[®], Boom Efekt[®], Fozát 480[®], Gladiátor 480 SL[®], Glialka Express 6H[®], Kapazin[®], Roundup[®] Classic, Total[®]), továbbá a DMA-, P-, AM- és DIAM-sót tartalmazó készítmények (Dominátor Extra 608 SL[®], Glialka Star[®], Glyfos Dakar[®], Medallon Premium[®], Roundup[®] Mega) ösztrogén és citotoxikus hatásai 5 órás kontaktidőnél. A1, A2 – IPA-sót tartalmazó és A3 – DMA-, P-, AM- és DIAM-sót tartalmazó készítmények ösztrogén aktivitása; B1, B2 – IPA-sót és B3 – DMA-, P-, AM- és DIAM-sót tartalmazó készítmények sejttoxicitása. A biolumineszcencia adatokat átlag ± szórás (SD) értékekkel fejeztem ki a kontroll százalékában.



22. ábra: *Glyphosate*-alapú készítmények (Dominátor Extra 608 SL[®], Fozát 480[®], Glyphos Dakar[®], Roundup[®] Mega) androgén hatásai 5 órás kontaktidőnél. A biolumineszcencia adatokat átlag ± szórás (SD) értékekkel fejeztük ki a kontroll százalékában.



ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY

IV. tézis: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzs alkalmazásával igazoltam, hogy a POE(15) formázóanyag ösztrogén aktivitással rendelkezik ($EC_{50}= 13,4$ mg/L), tehát képes a humán-ösztrogén receptorhoz kötődni, míg a *glyphosate* és az AMPA nem. Elsőként közöltem a vizsgált készítmények közvetlen ösztrogén és androgén hatásairól szóló *in vitro* eredményeket *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS teszttel mérve. A készítmények közül 7 ösztrogén, 4 androgén, míg 3 (Fozát 480[®], Dominátor Extra 608 SL[®], Roundup[®] Mega) ösztrogén- és androgén hatásúnak bizonyult.

A IV. tézis eredményeit az alábbi közleményben írtam le:

TÓTH, G., HÁHN, J., RADÓ, J., SZALAI, D., A., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2020): Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environmental Pollution*, 265, 115027. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115027> IF=8,07; Q1, D1.

5.1.5 A glyphosate-alapú készítmények citotoxicitása és hormonális aktivitása a hígítás százalékában kifejezve a mezőgazdasági és kiskerti felhasználásra ajánlott értékekhez képest

A **12. táblázatban** foglaltam össze az *Aliivibrio fischeri* és *Saccharomyces cerevisiae* BLYR citotoxicitási, valamint a BLYES és BLYAS által mért hormonális aktivitási effektív koncentráció értékekből (mg/L) (**7., 10., 11. táblázat**) százalékos arányra átszámított hígítási fokokat (%), melyeket az **1. táblázatban** feltüntetett *glyphosate*-alapú készítmények *glyphosate*-só tartalmából számoltam ki. A mezőgazdasági, kiskerti/háztartási felhasználásukhoz ajánlott hígításban, 0,2 – 3,5% közötti dózisban javasolt kijuttatni azokat. Az összes készítmény citotoxikus hatást gyakorolt az *Aliivibrio fischeri*-re egy, vagy két nagyságrenddel kisebb hígításban, mint a mezőgazdasági és/vagy kiskerti/háztartási felhasználásra ajánlott minimum dózis. Az akut vizsgálatban a Barclay Gallup Biograde 360[®] és a Boom Efekt[®] bizonyult a legkevésbé toxikusnak, de ezen készítmények legalacsonyabb ajánlott hígításának akár a fele is 50%-os biolumineszcencia gátlást eredményezett az *AVF*-ben 30 perces expozíció után. Hasonló jelenség volt megfigyelhető a közvetlen hormonális aktivitás mérésekor is: míg a Medallon Premium[®] ösztrogén aktivitását viszonylag magas (16%) hígítás mellett, addig a többi készítmény hormonális aktivitását 0,011 - 0,41% hígítás között azonosítottam. A Roundup[®] Mega androgén aktivitásának EC₅₀ értéke három nagyságrenddel alacsonyabb hígításnál fordult elő (az eredeti készítmény 7,15E-04%-a), mint a mezőgazdasági (0,15 - 3,5%) és a kiskerti/háztartási körülmények között ajánlott kijuttatási dózis (0,66 – 2%) minimuma.

12. táblázat: A citotoxicitási és a hormonális aktivitási tesztekéből származó EC₅₀ értékek átszámítva a glyphosate-alapú készítmények hígítási százalékára.

Készítmények	EC ₅₀ értékek tekintetében kalkulált hígítási fokok (%) a készítmények esetében					
	Akut AVF 30 perc	Krónikus AVF		BLYES törzs 5 óra	BLYAS törzs 5 óra	BLYR törzs 5 óra
		10 óra	15 óra			
Barclay Gallup Biograde 360 ^{® 1}	0,125	0,0009	0,0055	n.h.	n.h.	n.h.
Boom Efekt ^{® 1}	0,125	0,103	0,061	n.h.	n.h.	1,59
Fozát 480 ^{® 1}	0,03	0,065	0,017	0,035	0,011	0,23
Gladiátor 480 SL ^{® 1, 6}	0,03	0,078	0,021	0,018	n.h.	0,10
Gialka Express 6H ^{® 1}	0,04	0,041	0,012	n.m.	n.m.	0,046
Kapazin ^{® 1}	0,06	0,061	0,026	n.h.	n.h.	n.h.
Roundup [®] Classic ^{1, 6}	0,01	0,080	0,024	0,011	n.h.	0,021
Total ^{® 1}	0,015	0,009	0,040	0,015	n.h.	0,021
Gialka Star ^{® 3}	0,02	0,141	0,042	0,029	n.h.	0,029
Roundup [®] Mega ³	0,015	0,079	0,025	0,023	7,15E-04	0,025
Dominátor Extra 608 SL ^{® 2}	0,026	0,056	0,029	0,041	0,012	0,29
Glyfos Dakar ^{® 4}	0,04	0,011	0,083	n.h.	0,003	8,42
Medallon Premium ^{® 5}	0,02	0,008	0,006	16,13	n.h.	n.h.

Jelmagyarázat: ¹ – IPA-só; ² – DMA-só; ³ – P-só; ⁴ – AM-só; ⁵ – DIAM-só; ⁶ – POE(15) tartalmú készítmény; n.h. – nincs hatás; n.m. – nem mérhető a citotoxikus hatások miatt.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY

V. tézis: Az akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES/BLYAS bioripporter tesztek EC₅₀ értékei alapján 13, illetve 10 készítmény a szántóföldi és kiskerti körülmények között alkalmazott hígítási aránynál (0,2-3,5%-os) egy, vagy két nagyságrenddel (0,01-0,1%), illetve a környezetben is detektálható értékeknél (0,5%) kisebb koncentrációban is citotoxikus és endokrin diszruptor hatással rendelkezik. Bizonyítottam, hogy az aktív hatóanyagok értékelésén kívül sürgetően fontos feladat a kereskedelmi forgalomban kapható, szabadon megvásárolható készítmények komplex toxikológiai/ökotoxikológiai

felülvizsgálata is, humán- és környezetegészségügyi kockázataik feltárása, mivel a formázóanyagok/segédanyagok befolyásolják a toxikológiai hatást.

Az V. tézis eredményeit az alábbi közleményben írtam le:

TÓTH, G., HÁHN, J., RADÓ, J., SZALAI, D., A., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2020): Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environmental Pollution*, 265, 115027. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115027> IF=8,07; Q1, D1.

5.2 Potenciálisan peszticid-bontó baktériumnemzetségek keresése és jellemzése

A biodegradációs kísérleteimbe összesen 20 különböző nemzetséghez sorolható 36 mikrobafaj 45 törzsét vontam be, melyből 6 a gödöllői Talajvédelmi és Információs Monitoring rendszerből származó talajvízből, 9 a Budapesti Vegyiművek bioremediáció alatt álló talajából, 2 szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről származó talajvízből, 3 növényvédő szerekkel kezelt, intenzív mezőgazdasági területéről származó talajból/talajvízből/üledékből, 13 a Balaton részvízgyűjtő területéről származó felszíni vízből/mederüledékből származik (**13. táblázat**). További 13 a Környezetbiztonsági Tanszék birtokában lévő, különböző környezeti elemekből izolált, igazoltan specifikus metabolikus és biodegradációs képességekkel rendelkező baktériumtörzs (**14. táblázat**). Ezen felül, a *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó, nemzetközi gyűjteményekből származó 44 típus-törzs is vizsgáltam (**14. táblázat**).

A különböző *genus*-okon belül a szakirodalomban leírt törzsek biodegradációs képességeit, metabolikus aktivitási mutatóit az alábbiakban jellemzem.

13. táblázat: A glyphosate, mesotrione, S-metolachlor és a terbuthylazine biológiai lebonthatóságának vizsgálatára alkalmazott baktériumtörzsek.

Fajnév	Törzs jele	Törzs eredete
<i>Janthinobacterium lividum</i>	R5	TIM
<i>Arthrobacter oxydans</i>	R6	TIM
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	R8	TIM
<i>Brevundimonas nasdae</i>	R15	TIM
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	R17	TIM
<i>Pseudomonas monteilii</i>	R29	TIM
<i>Arthrobacter oxydans</i>	T3	BVM
<i>Pseudomonas geniculata</i>	T12	BVM
<i>Paracoccus denitrificans</i>	T13	BVM
<i>Advenella faeciporci</i>	T14	BVM
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	T20	BVM
<i>Bacillus aerophilus</i>	T23	BVM

<i>Bacillus aerophilus</i>	T25	BVM
<i>Bacillus firmus</i>	T29	BVM
<i>Bacillus safensis</i>	T30	BVM
<i>Pseudomonas veronii</i>	BUT-1/3	CH
<i>Rhodococcus defluvii</i>	BUT-2/13	CH
<i>Pseudomonas geniculata</i>	ISZ.2.20	MG
<i>Achromobacter spanius</i>	10.16	MG
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	TV.35	MG
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	N2	BAL
<i>Pseudomonas peli</i>	N6	BAL
<i>Stenotrophomonas indicatrix</i>	N12	BAL
<i>Shewanella xiamenensis</i>	N13	BAL
<i>Shewanella oneidensis</i>	N15	BAL
<i>Exiguobacterium acetilycum</i>	N20	BAL
<i>Aeromonas rivipollensis</i>	N22	BAL
<i>Exiguobacterium indicum</i>	N30	BAL
<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i>	N37	BAL
<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	N39	BAL
<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i>	N41	BAL
<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	N43	BAL
<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	N44	BAL

Jelmagyarázat: TIM – Talajvédelmi és Információs Monitoring rendszerből származó talajvíz; BVM – Budapesti Vegyiművek bioremediáció alatt álló talaja; CH – szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről származó talajvíz; MG – növényvédő szerekkel kezelt, intenzív mezőgazdasági területről származó talaj/talajvíz/üledék; BAL – Balaton részvízgyűjtő területéről származó felszíni víz/mederüledék.

14. táblázat: A glyphosate, mesotrione, S-metolachlor és a terbuthylazine biológiai lebonthatóságának vizsgálatára alkalmazott baktériumtörzsek.

Fajnév	Törzs jele	Törzs eredete	Fajnév	Törzs jele	Törzs eredete
<i>Rhodococcus aerolatus</i>	JCM 19485	TÍP	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	JCM 14343	TÍP
<i>Rhodococcus agglutinans</i>	KCTC 39118	TÍP	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	JCM 14914	TÍP
<i>Rhodococcus antrifimi</i>	KCTC 29469	TÍP	<i>Rhodococcus kunmingensis</i>	JCM 15626	TÍP
<i>Rhodococcus artemisiae</i>	DSM 45380	TÍP	<i>Rhodococcus soli</i>	JCM 19627	TÍP
<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	DSM 44587	TÍP	<i>Rhodococcus kyotonensis</i>	JCM 23211	TÍP
<i>Rhodococcus biphenylivorans</i>	KCTC 29673	TÍP	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	JCM 3200	TÍP
<i>Rhodococcus canchipurensis</i>	JCM 17578	TÍP	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM 3201	TÍP
<i>Rhodococcus cerastii</i>	DSM 45579	TÍP	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	JCM 3202	TÍP
<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	DSM 45141	TÍP	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	JCM 3203	TÍP
<i>Rhodococcus degradans</i>	CCM 4446	TÍP	<i>Rhodococcus ruber</i>	JCM 3205	TÍP
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	DSM 45222	TÍP	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	JCM 3376	TÍP
<i>Rhodococcus jialingiae</i>	DSM 45257	TÍP	<i>Rhodococcus globerulus</i>	JCM 7472	TÍP
<i>Rhodococcus trifolii</i>	DSM 45580	TÍP	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	JCM 9689	TÍP
<i>Rhodococcus nanhaiensis</i>	DSM 45608	TÍP	<i>Rhodococcus opacus</i>	JCM 9703	TÍP
<i>Rhodococcus lactis</i>	DSM 45625	TÍP	<i>Rhodococcus zopfii</i>	JCM 9919	TÍP
<i>Rhodococcus enclensis</i>	DSM 45688	TÍP	<i>Cupriavidus basilensis</i>	ÖR16	TAN
<i>Rhodococcus defluvii</i>	DSM 45893	TÍP	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	TBF2/20.2	TAN
<i>Rhodococcus sovatisensis</i>	H004T	TÍP	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	AK-44	TAN
<i>Rhodococcus fascians</i>	JCM 10002	TÍP	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	GD2A	TAN

<i>Rhodococcus percolatus</i>	JCM 10087	TÍP	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	AK-37	TAN
<i>Rhodococcus koreensis</i>	JCM 10743	TÍP	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	CHB-15p	TAN
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	JCM 10940	TÍP	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	K402	TAN
<i>Rhodococcus tukisamuensis</i>	JCM 11308	TÍP	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	K404	TAN
<i>Rhodococcus maanshanensis</i>	JCM 11374	TÍP	<i>Rhodococcus quingshengi</i>	PT2/14B	TAN
<i>Rhodococcus jostii</i>	JCM 11615	TÍP	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	GS-5	TAN
<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	JCM 13011	TÍP	<i>Streptomyces caniferus</i>	K176	TAN
<i>Rhodococcus imtechensis</i>	JCM 13270	TÍP	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	K108	TAN
<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	JCM 13366	TÍP	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	K128	TAN
<i>Rhodococcus triatomae</i>	JCM 13396	TÍP			

Jelmagyarázat: JCM – Japán mikroorganizmusok gyűjteménye (Japan Collection of Microorganisms), DSM – Német mikroorganizmusok és sejt kultúrák gyűjteménye (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), KCTC – Koreai típusörzések gyűjteménye (Korean Collection for Type Cultures), CCM – Cseh mikroorganizmusok gyűjteménye (Czech Collection of Microorganisms). TÍP – *Rhodococcus* típusörzések gyűjtemény tagjai (törzs jelének feloldása a jelmagyarázatban), amelyek nem jelentenek humán- és környezetegészségügyi kockázatot; TAN – Tanszék birtokában lévő, különböző környezeti elemekből izolált, igazoltan specifikus metabolikus és biodegradációs képességekkel rendelkező baktériumörzések.

Aeromonas nemzetség: képviselői jellemzően vízi környezetben előforduló ubikviter baktériumok. Több törzset opportunistá, illetve fakultatív halpatogén mikroszervezetekként tartanak számon (BENHAMED *et al.* 2014). Gyakran előfordulnak PCB és nehézfém szennyezett környezetben. Naftalin (>90%), pirén (20%) és fluorantén (20%) esetében hatékony bontást mutattak, egyes izolátumok képesek az azofestékek, tributilón, *cylindrospermopsin* cianotoxin bontására (ŠYVOKIENĚ & MICKĚNIENĚ 2011, MNIF *et al.* 2016, CRUZ *et al.* 2007, DZIGA *et al.* 2016).

Achromobacter nemzetség: szennyezett területről izolált képviselői egyéni törzsenként, vagy baktériumközösségek tagjaiként képesek a 2,4,6-trinitrotoluol (TNT) (GUMUSCU & TEKINAY 2013), PAH vegyületek (BACOSA & INOUE 2015, VIÑAS *et al.* 2005), dízel üzemanyag (MARTIN-SANCHEZ *et al.* 2018), *iprodione* fungicid (CAMPOS *et al.* 2015) degradációjában részt venni.

Advenella nemzetség: egyes tagjai a nitrifikálás-denitrifikálás folyamatában jeleskednek (MATSUOKA *et al.* 2012), ko-kultúrában a fenol lebontásában vesznek részt (LI *et al.* 2020), képesek a *p-cresol* biológiai eltávolítására (XENOFONTOS *et al.* 2016), illetve a DDT* aerob biodegradációjára (ABBES *et al.* 2018).

Arthrobacter nemzetség: képviselőit nagy részben vízi környezetből izolálták, számos alkalommal igazolták a PAH-ok, benzo[a]pirén degradációjában való szerepüket (THION *et al.* 2012, 2013; PENG *et al.* 2012), szerves foszforsav típusú inszekticidok (KAZUFUMI *et al.* 1996), konzorciumban az *atrazine** gyomirtó szer hatóanyag (JIANG *et al.* 2019), o-

metoxibenzoát (GIL *et al.* 2000), poliklórozott bifenilek (PCB-k) (GILBERT & CROWLEY 1997) bontását végzik.

Bacillus nemzetség: metabolikus aktivitás szempontjából az egyik legnagyobb és legszélesebb palettán mozgó *genus*. A nemzetség tagjai képesek *phorate** és a *chlorpyrifos** inszekticidek degradációjára (JARIYAL *et al.* 2014, SABDONO 2006), poliazo-festékek színtelenítésére (ARORA *et al.* 2011, OGUGBUE *et al.* 2012). A *mesotrione* biodegradációja már jól definiált folyamatként ismert a *Bacillus* sp. törzsei között (BATHISSON *et al.* 2009; DURAND *et al.* 2006a, 2006b, 2010; LIU *et al.* 2015). A szakirodalomból ismert, hogy bizonyos izolátumok a biopeszticidek, szénhidrogén típusú vegyületek, HMW-PAH-ok, TPH-k, diklóranilin izomerek, polivinil-alkohol, dízel üzemanyag bontását végzik (MAITI *et al.* 2012, YUDONO *et al.* 2010, YAO *et al.* 2011, MORI *et al.* 1996, KEBRIA *et al.* 2009). MS11 izolátum arzén-, bór- és sótüdő, illetve multinehézfém rezisztens, így potenciálisan lehet alkalmazni arzénnel szennyezett, magas sótartalmú talajokon remediációs céllal (RAJA & OMINE 2012).

Brevibacterium nemzetség: képviselőiről azo-festékek (FRANCISCON *et al.* 2012), *cyclohexylamine* (IWAKI *et al.* 1999), piretroid típusú inszekticid, a *cyfluthrin* (CHEN *et al.* 2013), *phorate** (JARIYAL *et al.* 2015), aszfaltének (EMTIYAZJOO *et al.* 2014) bontásában való részvételéről is beszámoltak.

Brevundimonas nemzetség: tagjai különféle típusú olajszennyezések felszámolásában (BASUKI 2017, WANG *et al.* 2015), foszfortartalmú szerves rovarölő hatóanyag, a *malathion** biodegradációjában (ZHAO *et al.* 2011).

Cupriavidus nemzetség: számos képviselőjénél azonosítottak már xenobiotikumok degradációját – *chlorpyrifos** és a *3,5,6-trichloro-2-pyridinol* (LU *et al.* 2013), nitrogén-tartalmú heterociklusos aromás *indole*-t (QU *et al.* 2015), ezen felül detoxifikálva az aromás nitrofenolt (TIWARI *et al.* 2017), gyorsan bontva a 2,4-D herbicidet (WU *et al.* 2017), 2,6-dibromo-4-nitrofenolt (MIN *et al.* 2019), akrilamidot (BEDADE & SINGHAL 2018). Az általam is biodegradációs kísérletekbe vont, a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék birtokában lévő ÖR16 jelű *Cupriavidus basilensis* faj törzse korábbi kutatási eredmények szerint az *Ochratoxin A* (OTA) mikotoxin (FERENCZI *et al.* 2014), *atrazine** herbicid (HÁHN *et al.* 2017) degradációjára volt képes.

Exiguobacterium nemzetség: hozzávetőlegesen három évtizeddel ezelőtt írták le ezt az igen sokoldalú nemzetséget, melyen belül 17 fajt ismernek el, amelyek széles tartományban lévő

hőmérsékleti és pH viszonyok között képesek növekedni. Több specifikus, metabolikus tulajdonságról szóló közleményt adtak közre (KASANA & PANDEY 2018). Az egyik ilyen, a rákpáncél hulladékok deprotenizációja, dimineralizációja nagy mennyiségű és nagy hatékonyságú proteáz enzim segítségével (SOROKULOVA *et al.* 2009). *Exiguobacterium sp.* NIU-K2 törzs képes bontani a nitroaromás szerkezetű 4-NBA festéket (HSUEH *et al.* 2016), CR1 törzs képes tolerálni igen nagy koncentrációjú radioaktív céziumot, gamma sugárzási rezisztenciával rendelkezve - bioremediációs céllal alkalmazva - eliminálva a céziumot környezeti mintákból (OH *et al.* 2018). Szabad cianid és tiocianát (MEKUTO *et al.* 2016), *paraoxon* (IYER & IKEN 2013) és norgesztrel, női hormon biodegradációját is kapcsolatba hozták velük (LIU *et al.* 2013).

Janthinobacterium nemzetséghez: tartozó egyik tagjáról (*Janthinobacterium lividum*), melyet a vizsgálataimba vontam, igazolták, hogy felelős a *terbutylazine* lebontásáért (CARACCILO *et al.* 2010).

Microbacterium nemzetség: először a trichotecén vázas mikotoxinok (NAKAYAMA *et al.* 1980), a xilán (PARK *et al.* 2006) degradációját is igazolták a nemzetségben belül. Mikrobiális konzorciumokban képesek degradálni a mono-, di-, és triklórifenolokat egyedüli szén- és energiaforrásként (SALMERÓN-ALCOCER *et al.* 2007) *Microbacterium sp.* MEL1 törzséről a szakirodalom a melamin (szimmetrikus-triazin) bontásának kapcsán számol be, amely kémiai szerkezetében hasonló a *terbutylazine*-hoz (SHIOMI & AKO 2012). Korábban a *Microbacterium trichothecenolyticum* esetében sikerült a *terbutylazine* degradációját megállapítanom (TÓTH 2015).

Olivibacter nemzetség: 2007 óta ismert *genus*-ként van nyilvántartva, amelybe azóta 9 fajt számlál (HTTP9). A kísérleteimbe bevont *Olivibacter oleidegradans* a Szent István Egyetem (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem jogelődje) Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszéke által 2011-ben leírt faj, melynek kapcsán először sikerült igazolni a *genus*-on belül kőolaj bontó képességet (SZABÓ *et al.* 2011).

Paenarthrobacter nemzetséget: 2016-ban alkották meg, az *Arthrobacter* nemzetség egyes tagjait újraminősítve és átsorolva ebbe a *genus*-ba (BUSSE 2016). Az *Arthrobacter* fajokról már többen is leírták, hogy képesek lebontani a környezetszennyező anyagokat, például a nitroglicerint, sok benzolszármazékot, policiklusos aromás vegyületet, halogénalkoholokat, halogénalkánokat, N-heterociklusos vegyületeket, peszticideket (*atrazine**, s-triazin gyűrűt tartalmazó vegyületek). Jelenleg 6 faj sorolható a nemzetséghez (*Paenarthrobacter aurescens*,

Paenarthrobacter histidinovorans, *Paenarthrobacter ilicis*, *Paenarthrobacter nicotinovorans*, *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*, *Paenarthrobacter ureafaciens*) közülök 2 az általam identifikált baktériumokból (*P. nitroguajacolicus*, *P. ureafaciens*) (HTTP10). Tagjaik kapcsán beszámoltak már nitroaromás és heterociklusos aromás vegyületek (4-nitroguajakol, 4-nitrofenol, 4-klórifenol, 4-brómfenol, 4-fluorofenol, 4-idiofenol, kinolin) biológiai degradációjáról, *atrazine**-nal szennyezett talajból (*P. aurescens* TC1, mely rendelkezik az *atrazine** degradációért felelős plazmidon kódolt génekkel) és a köszénkátrány-finomító gyár szennyvíziszapjából izolálva azokat (BUSSE 2016, STRONG *et al.* 2002, KOTOUČKOVÁ *et al.* 2004, KOWALCZYK *et al.* 2015, BAE *et al.* 1996, HUND *et al.* 1990, YAO *et al.* 2015).

Paracoccus nemzetség: első típus törzse a *Paracoccus denitrificans* (1910) volt, amely anaerob körülmények között denitrifikáló baktérium (BAUMANN *et al.* 1996), továbbá doktori kutatómunkám során kísérletekbe vontam. A nemzetség képviselővel kapcsolatban poli-3-hidroxi-butirát (GAO *et al.* 2001), piridin (BAI *et al.* 2008), PAH (GUO *et al.* 2005), *carbofuran**, *chlorpyrifos**, 3,5,6-triklór-2-piridinol, metil-*parathion** (PENG *et al.* 2008, XU *et al.* 2008b), *Paracoccus sp.* FLY8 törzse által (hat klóracetamid típusú herbicid közül) a *metolachlor** (ZHANG *et al.* 2011), dimetilformamid (NISHA *et al.* 2015) degradációja ismeretes.

Pseudarthrobacter nemzetség: a nemzetséget a *Paenarthrobacter* genus-hoz hasonlóan 2016-ban hozták létre 11 taggal, melyet az *Arthrobacter* nemzetség taxonómiai felülvizsgálata miatt a benne helyet foglaló fajok kerültek átsorolásra (BUSSE 2016). A *P. sulfonivorans* Ar51 törzse pszichrotoleráns módon képes a nyersolajat és multibenzol származékokat degradálni (ZHANG *et al.* 2016). Továbbá, a nemzetség metabolikus képességeire a fentebb, az *Arthrobacter* nemzetségnél leírtak vonatkoznak.

Pseudomonas nemzetség: képviselői ubikviter baktériumok, közülük sokan bontanak komplex/toxikus természetes és szintetikus szerves vegyületeket is. *Glyphosate*-ot 3 törzs (22, 4ASW, GLC11) (PENALOZA-VAZQUEZ *et al.* 1995, DICK & QUINN 1995b, SELVAPANDIYAN & BHATNAGAR 1994), ko-kultúrában *terbuthylazine*-t (JURINA *et al.* 2014), *metolachlor**-t (MARTINS *et al.* 2007), formaldehidet (LIU *et al.* 2014b), biszfenol-A-t (MASUDA *et al.* 2007), tetralin-t (LIE *et al.* 2009), PAH-t (AL-THANI *et al.* 2009), norgesztrelt (LIU *et al.* 2013), nikotint (LIU *et al.* 2014c), diplomadolgozatomban leírtak alapján *terbuthylazine*-t (TÓTH 2015), *chlorpyrifos**-t (DELLAI *et al.* 2016) degradálják.

Rhodococcus nemzetség: aerob, Gram-pozitív és nem mozgékony bakteriális sejtek, melyek mikolikus savakat tartalmaznak. Ennek a nemzetségnek a bonyolult filogenetikai felépítését és a különböző fajok azonosításának nehézségeit hangsúlyozza hosszú rendszertani története. A *Rhodococcus* fajok metabolikus képlékenyséjük miatt rendkívül érdekesek a tudomány számára. Jellegzetesen nagy genomjukkal, redundáns és sokoldalú katabolikus útvonalak mentén, képességükkel a hidrofób vegyületek felvételére és metabolizálására, biofilmek kialakítására, kedvezőtlen körülmények között való túlélőképességükkel, valamint a géntechnológia nemrégiben kifejlesztett eszközeinek köszönhetően biotranszformációs és biológiai lebonthatósági folyamatok résztvevői. Oxidatív anyagcseréjük miatt képesek nagyszámú szerves vegyület felhasználására egyedüli szén- és energiaforrásként, amely számos ipari- és bioremediációs alkalmazást segített elő. A törzsek képesek lebontani és/vagy átalakítani a rendkívül (természetes folyamatoknak) ellenálló/perzisztens toxikus vegyületeket, ideértve az alifás, monoaromás és poliaromás szénhidrogéneket, valamint a heterociklusos aromás vegyületeket, szulfonát azoszínfestékeket, rovarirtókat, karbamátokat, klórozott fenolokat, amelyek alkalmassá teszik őket biokatalitikus és bioremediációs folyamatokban/rendszerekben. Képesek kénteleníteni azokat a tűzálló szerves kénvegyületeket, amelyeket az olajipar, hagyományos vegyi alapú technológiáival nehéz kénteleníteni (GÜRTLER *et al.* 2004, MARTÍNKOVÁ *et al.* 2009, DE CARVALHO *et al.* 2014).

Shewanella nemzetség: egyes képviselői képesek a reduktív dehalogenizációra, festékek elszíntelenítésére, bontására (HUANG *et al.* 2010, NG *et al.* 2014), nitrát redukciójára, MR-1 törzs metil-narancs és naftol-zöld B festékeknek anaerob biodekloronizációja anaerob viszonyok mellett, *lindane** biokatalitikus deklórozására (CAI *et al.* 2012, XIAO *et al.* 2012, MERTENS *et al.* 2007).

Stenotrophomonas nemzetség: esetében az azofestékek színtelenítésében (KHEHRA *et al.* 2005), fenantrén (ANDREONI *et al.* 2004), *glyphosate* (NOUROUZI *et al.* 2011), petrokémiai maradékanyagok alifás és aromás összetevőinek (CERQUEIRA *et al.* 2012) ko-kultúrában a fenol (LI *et al.* 2020), szerves foszfortartalmú peszticidek (DENG *et al.* 2015), *p*-nitrofenol és 4-klórfenol (LIU *et al.* 2007), poliaromás szénhidrogének (TIWARI *et al.* 2016) lebontásában, akrilamid detoxifikációjában, biodegradációjában (LAKSHMIKANDAN *et al.* 2014) vesznek részt.

Streptomyces nemzetség: tagjai is tökéletes résztvevői a biodegradációs folyamatoknak. Leírták már róluk, hogy egyéni törzsként és konzorciumban a *metolachlor** (LIU *et al.* 1990,

ELSAYED *et al.* 2015), *glyphosate* (OBOJSKA *et al.* 1999), klórozott szénhidrogén-típusú rovarirtó hatóanyagok [*aldrin**, *chlordane**, DDD, DDE, DDT*, *dieldrin**, *heptachlor**, *lindane**, *methoxychlor**] (BENIMELI *et al.* 2003), aflatoxin-B1 és zearalenon mikotoxinok (HARKAI *et al.* 2016).

5.3 A herbicid hatóanyagok biodegradációja és biodetoxifikációja

Annak érdekében, hogy a vizsgált törzsek esetében a mikrobiális úton végbemenő degradáció mértékét megállapíthassam, a **4.8 fejezetben** leírt kémiai-analitikai módszerekkel meghatározták a herbicid hatóanyagok koncentrációját a vizsgálati közegből. A herbicidek biodegradációjára irányuló kísérleteimet 5 mg/L-es kiindulási koncentrációban végeztem el (kezdetben egy beállításban) - a felülúszó és a bakteriális pellet minták mérése külön-külön történt a **13. és 14. táblázatban** szereplő baktériumokkal.

Amennyiben egy mérésből az analitikai eljárásokkal legalább elégséges biodegradációs hatékonyságot tudtam megállapítani a *glyphosate* és a *mesotrione* esetében ($\geq 30\%$), az *S-metolachlor* esetében ($\geq 60\%$) és a *terbuthylazine* esetében ($\geq 35\%$) vizsgálataimat három párhuzamos beállításban is elvégeztem. A három párhuzamos beállításban végzett kísérletek eredményeiből átlagot számítottam és szórás értékeikkel együtt tüntettem fel táblázatokban.

Vizsgált hatóanyagokként szétválasztva az eredményeimet a különböző degradációs potenciálú törzsek feltüntetése után a törzsek biodetoxifikációs képességeit ismertetem. A biodegradációs kísérletekből származó minták maradékanyagainak citotoxicitási vizsgálatára az „**Anyagok és Módszerek**” **4.1.3 alfejezetében** leírtak szerint a krónikus *AVF* tesztet alkalmaztam (a tiszta hatóanyagok nem rendelkeztek direkt hormonhatással, bomlástermékeik a szakirodalom alapján nem rendelkeznek ilyen hatással). Mikroorganizmusonként, a vegyületekre 10 és 15 órás kontaktidőnél adott gátlási százalékokat, amely a három párhuzamos beállításból származó minták három párhuzamosban mért átlag és szórás értékéből áll, oszlopdiagram ábrán szemléltetem. A két kontaktidő alkalmazásánál figyelembe vettem, hogy ezeknél bizonyult a tesztszervezet a legmegbízhatóbbnak, ezért az értékelésnél ezeket az adatokat adtam meg.

5.3.1 *A baktériumtörzsek biodegradációs és biodetoxifikációs képessége aerob körülmények között*

Glyphosate aerob biodegradációja és biodetoxifikációja

A *glyphosate* oxigénnel ellátott körülmények között végbemenő, biológiai úton zajló lebontásával kapcsolatban, mindösszesen három *Rhodococcus* típusú törzs^T esetében tudtam csak

elégleges degradációt detektálni (*R. jostii* JCM 11615^T – 30,9%, *R. koreensis* JCM 10743^T – 32,1%, *R. coprophilus* JCM 3200^T – 34,5%) az egy beállításban elvégzett mérések alapján, az egyedi kultúrák felülúszó, vizes fázisában. A baktériumpelleten, a herbicid molekula esetleges megkötődésének ellenőrzését elvégeztem és csekély mennyiségű adszorpciós jelenséget ($\leq 7\%$) azonosítottam. Eredményeim visszaigazolása céljából az ismételt, három párhuzamos beállításban elvégzett kísérleteim során nem tudtam bizonyítani az előszelektációs kísérleteim biodegradációs hatásfokát - a három törzs nem mutatott legalább elégleges bontási kapacitást sem. Az elégtelen biodegradációs kapacitás miatt nem vizsgáltam a maradékanyagok citotoxicitásának megszűnését.

Mesotrione aerob biodegradációja és biodetoxifikációja

A *mesotrione* hatóanyag esetében egy vizsgált törzsnél sem tudtam megállapítani legalább elégleges biodegradációs hatékonyságot. A legnagyobb detektált lebontást a kontroll mintákhoz viszonyítva a T25 jelű *Bacillus aerophilus* fajnál tudtam kimutatni, közel 20%-os elhanyagolható hatékonyságot (19,9%) elérve a vegyület eliminálásában (koncentráció: 5 mg/L, 1 beállításban, LB tápoldatban). A kimutatott eredmény összefüggésben állhat a *Bacillus* nemzetség képviselőiről feltárt, *mesotrione* molekula degradációjával kapcsolatos metabolikus útvonalak meglétéről a *genus*-ban (BATISSON *et al.* 2009; DURAND *et al.* 2006a, 2006b, 2010; LIU *et al.* 2015). Az eredménytelenül záródó biodegradáció következtében a mikroba biodetoxifikációs képességét nem vizsgáltam.

S-metolachlor aerob biodegradációja és biodetoxifikációja

Az *S-metolachlor* aerob bontásában résztvevő nemzetségek képessége széles skálán mozog. Összesen tizenkettő törzs tudta 60% vagy annál nagyobb mértékben lebontani a vegyületet a kontroll mintához viszonyítva egy beállításban. Négy közülük a *Bacillus*, három a *Pseudomonas*, egy-egy pedig az *Advenella*, az *Arthrobacter*, a *Microbacterium*, a *Paracoccus* és a *Streptomyces* nemzetség képviselője volt. A bakteriális biomasszán három esetben volt kimutatható 10%-nál nagyobb adszorpciós jelenség a *Pseudomonas geniculata* (10,52%), az *Advenella faeciporci* (12,02%) és a *Bacillus aerophilus* (13,16%) esetében. A három párhuzamos beállításban végzett ismételt mérések eredményei egy esetben támasztották alá a törzsek degradáló képességeit. A K176 jelű *Streptomyces caniferus* törzs kiváló hatékonysággal bontotta (94,6% \pm 1,1%) a vegyületet. A K176 esetében a lebontást igazolja, hogy a pelleten kötött *S-metolachlor* kiindulási

koncentrációjának még az 1%-át (0,68) se érte el az előkísérletek alapján. A *Streptomyces caniferus* képes volt a vegyület biotetoxifikációjára úgy, hogy a krónikus AVF tesztben 10. és 15. órára fénykibocsátás emelkedést, azaz a citotoxicitás megszűnését detektáltam.

Terbuthylazine aerob biodegradációja és biotetoxifikációja

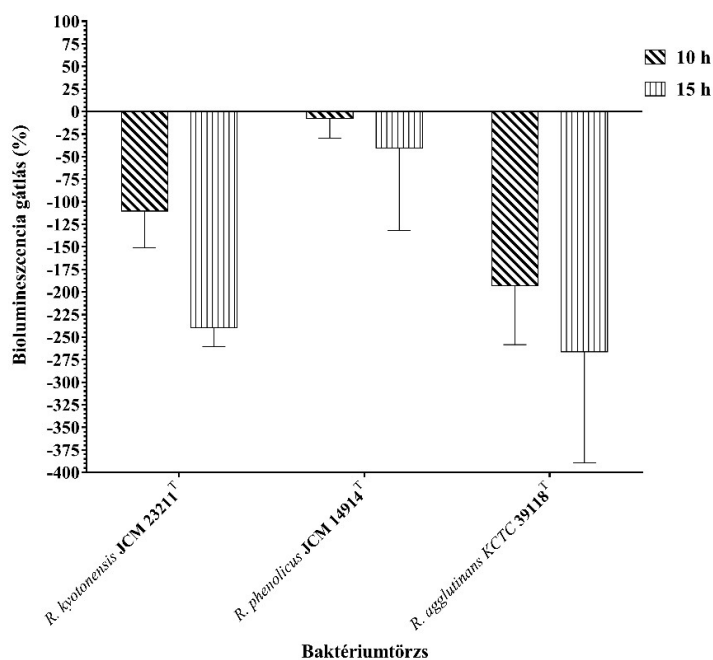
A *terbuthylazine* részleges degradációjára öt *Rhodococcus* típus törzs^T volt képes. Az egy beállítással zajló kísérletek alapján közepes (50-65%) mértékű degradációt tapasztaltam. Ezt követően a három párhuzamos beállítású vizsgálatoktól várva a degradáció visszaigazolását - ötből három típus törzs^T biomasszáján (*R. kyotonensis* JCM 23211^T, *R. phenolicus* JCM 14914^T, *R. agglutinans* KCTC 39118^T) az elvégzett pelletvizsgálatok szerint jelentős mértékű extrahált peszticid koncentráció (40-65%) volt kimutatható. A legnagyobb pelleten mért *terbuthylazine* koncentrációt (a beállított 5 mg/L $62,6 \pm 10,4\%$ -át) a *R. phenolicus* biomasszájában mérték (**15. táblázat**). Az előkísérletek eredményeiből feltételezhető, hogy az egy beállításban elvégzett biodegradációs vizsgálatok felülűszójában tapasztalt közepes *terbuthylazine* eltávolítás nem a biodegradációnak, hanem bioadszorpciónak volt köszönhető.

15. táblázat: A *terbuthylazine* aerob körülmények között végzett 7 napos biodegradációs kísérleteinek eredményei LB tápoldatban kémiai-analitikai módszerrel mérve.

Törzs jele	Faj neve	A kiindulási <i>terbuthylazine</i> (5 mg/L) megmaradt mennyisége a baktérium felülűszókban 3 párhuzamos beállításban mérve (%-ban kifejezve a kontrollhoz viszonyítva átlag \pm szórás)	Kiindulási <i>terbuthylazine</i> koncentráció megkötődése a baktérium pelleten 3 párhuzamos beállításban (%-ban kifejezve)
JCM 23211 ^T	<i>R. kyotonensis</i>	$42,9 \pm 13,6$	$50,6 \pm 5,8$
JCM 14914 ^T	<i>R. phenolicus</i>	$57,1 \pm 0,0$	$62,6 \pm 10,4$
KCTC 39118 ^T	<i>R. agglutinans</i>	$63,5 \pm 9,2$	$41,3 \pm 20,2$

A bioadszorpció folyamatok miatt a felülűszóban megmaradt *terbuthylazine* maradékanyag mennyiség (~2-3 mg/L) a krónikus AVF biológiai hatásmérő tesztben nem volt sejtoxikus ($EC_{50, 10\text{óra}} = 4,9$ mg/L; $EC_{50, 15\text{óra}} = 9,6$ mg/L) sőt, a felülűszóban maradt *terbuthylazine* fénykibocsátás serkentést generált (**23. ábra**).

23. ábra: A *terbuthylazine* 7 napos biodegradációs kísérletből származó maradékanyagok által kiváltott biolumineszcencia gátlás 10 (h) és 15 (h) órás kontaktidőnél krónikus *AVF* tesztben. A maradékanyagok hatása a *terbuthylazine* nélkül inkubált törzsek bakteriális anyagcseretermékeihez viszonyítva és azzal korrigálva. A pozitív gátlási értékek a rendszerben visszamaradt maradékanyagok által az *AVF*-re kifejtett biolumineszcencia gátlást, a negatív értékek a biolumineszcencia intenzifikációt jelentik.



5.3.2 A baktériumtörzsek biodegradációs és biodetoxifikációs képessége mikroaerob körülmények között

A mikroaerob kísérletek egy beállításban, ásványisó (FAHY) tápoldatban, 5 mg/L-es kiindulási peszticid koncentrációval kiviteleztem, azokkal a baktérium törzsekkel, amelyek az 5.3.1 fejezetben legalább elégséges hatásfokkal biodegradálták a hatóanyagokat. A *glyphosate*, *mesotrione* és a *terbuthylazine* mikroaerob lebontását nem vizsgáltam az aerob lebontási kísérletek eredménytelensége miatt. Az *S-metolachlor*-t aerált körülmények között eredményesen lebontó *Streptomyces caniferus* K176, a vegyület jelentéktelen, 17,3%-os csökkenését eredményezte mikroaerob körülmények között.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY

VI. tézis: Az aerob körülmények között elvégzett biodegradációs kísérletek során először igazoltam azt, hogy a *Streptomyces caniferus* K176 törzs képes az *S-metolachlor* közel 95%-os lebontására az *Aliivibrio fischeri*-re nézve krónikus toxicitású maradékanyagok keletkezése

nélkül. A K176 törzs mikroaerob körülmények között azonban nem képes a vegyület biodegradációjára és biodetoxifikációjára. A *terbutylazine* esetében először bizonyítottam, hogy a *Rhodococcus kyotonensis* JCM 23211^T, a *Rhodococcus phenolicus* JCM 14914^T, a *Rhodococcus agglutinans* KCTC 39118^T törzsek képesek a vegyületet biomasszájukon adszorbeálni, míg a folyadék fázisú maradékanyag nem volt sejttoxikus a krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. tézis: A *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* herbicid hatóanyagok különböző arányú kombinációinak először állapítottam meg az akut (30 perc) és krónikus (10 és 15 óra) effektív koncentráció értékeit az *Aliivibrio fischeri* tesztszervezetre nézve (kivételt képezi a *mesotrione* + *S-metolachlor* 1:1 arányú keveréke az akut Microtox[®] tesztet alkalmazva). Az *Aliivibrio fischeri* tesztszervezet a krónikus tesztben 10 és 15 órás kontaktidőknél bizonyult a legérzékenyebbnek, amelyben a tiszta hatóanyagok közül a *terbuthylazine* ($EC_{50\ 10\ \text{és}\ 15\ \text{óra}} = 4,9$ és $9,6$ mg/L), a keverékek közül a *mesotrione* + *terbuthylazine* Calaris Pro[®] készítmény szerinti keveréke ($EC_{50\ 10\ \text{és}\ 15\ \text{óra}} = 16,4$ és $19,5$ mg/L) váltotta ki a legnagyobb toxikus hatást. A *terbuthylazine* mellett *mesotrione*-t és *S-metolachlor*-t tartalmazó három készítmény szerinti keverék krónikus tesztben kapott EC_{50} értéke az akut teszthez képest egy nagyságrenddel kisebb volt. A prokarióta tesztorganizmust alkalmazó krónikus teszt önálló ellenőrző/értékelő vizsgálati módszerként alkalmas keverékhatások megállapítására.

II. tézis: A Kombinációs Index Módszer segítségével elsőként állapítottam meg a *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* különböző arányú keverékeinek komponensei között fellépő antagonist, additív és szinergista hatásokat az egyes hatásos koncentrációszinteken akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben. Az akut tesztben 50%-os toxikus koncentráción (EC_{50}) az összes keverék esetében szinergia volt detektálható. Az azonos arányú (1:1) *mesotrione* és *S-metolachlor* keverék akut tesztben minden hatásos koncentráción (még EC_{10} -nél is = $5,1$ mg/L), míg a krónikus tesztben (10 és 15 órás kontaktidőnél) EC_{50} , EC_{80} , EC_{90} értékeken additív és szinergista hatást mutatott. A krónikus tesztben a többi keverék minden hatásos koncentráción antagonist választ eredményezett.

III. tézis: A *glyphosate*, az AMPA, a POE(15) tiszta vegyületek és 13 *glyphosate*-alapú herbicid készítmény esetében először írtam le az *Aliivibrio fischeri* ökotoxikológiai tesztorganizmusra gyakorolt krónikus, valamint 12 készítmény (kivéve Roundup[®] Classic) által kiváltott akut citotoxikus hatást. Az akut és krónikus tesztben a *glyphosate*-sav és az AMPA metabolit a legnagyobb alkalmazott koncentrációnál (5 g/L) nem bizonyult toxikusnak. Ezzel szemben a 11 készítmény 44-623 mg/L közötti koncentrációkban 50%-os toxikus hatást fejtett ki a rövid- és hosszú távú tesztekben. *Glyphosate*-só tartalomra számítva a felhasználásra kész Glialka Express 6H[®] ($EC_{50\ 10\ \text{és}\ 15\ \text{óra}} = 3,9$ mg/L és $1,2$ mg/L) és a nem deklarált formázó-, segédanyag tartalmú

Barclay Gallup Biograde 360[®] (EC₅₀ 10 és 15 óra= 4,5 mg/L és 26,4 mg/L) bizonyult a két legtoxikusabb *glyphosate*-alapú készítménynek. A citotoxikus hatások és a készítményekben található *glyphosate*-só típusok között nem volt kimutatható összefüggés.

IV. tézis: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzs alkalmazásával igazoltam, hogy a POE(15) formázóanyag ösztrogén aktivitással rendelkezik (EC₅₀= 13,4 mg/L), tehát képes a humán-ösztrogén receptorhoz kötődni, míg a *glyphosate* és az AMPA nem. Elsőként közöltem a vizsgált készítmények közvetlen ösztrogén és androgén hatásairól szóló *in vitro* eredményeket *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS teszttel mérve. A készítmények közül 7 ösztrogén, 4 androgén, míg 3 (Fozát 480[®], Dominátor Extra 608 SL[®], Roundup[®] Mega) ösztrogén- és androgén hatásúnak bizonyult.

V. tézis: Az akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES/BLYAS bioripporter tesztek EC₅₀ értékei alapján 13, illetve 10 készítmény a szántóföldi és kiskerti körülmények között alkalmazott hígítási aránynál (0,2-3,5%-os) egy, vagy két nagyságrenddel (0,01-0,1%), illetve a környezetben is detektálható értékeknél (0,5%) kisebb koncentrációban is citotoxikus és endokrin diszruptor hatással rendelkezik. Bizonyítottam, hogy az aktív hatóanyagok értékelésén kívül sürgetően fontos feladat a kereskedelmi forgalomban kapható, szabadon megvásárolható készítmények komplex toxikológiai/ökotoxikológiai felülvizsgálata is, humán- és környezetegészségügyi kockázataik feltárása, mivel a formázóanyagok/segédanyagok befolyásolják a toxikológiai hatást.

VI. tézis: Az aerob körülmények között elvégzett biodegradációs kísérletek során először igazoltam azt, hogy a *Streptomyces caniferus* K176 törzs képes az *S-metolachlor* közel 95%-os lebontására az *Aliivibrio fischeri*-re nézve krónikus toxicitású maradékanyagok keletkezése nélkül. A K176 törzs mikroaerob körülmények között azonban nem képes a vegyület biodegradációjára és biodetoxifikációjára. A *terbuthylazine* esetében először bizonyítottam, hogy a *Rhodococcus kyotonensis* JCM 23211^T, a *Rhodococcus phenolicus* JCM 14914^T, a *Rhodococcus agglutinans* KCTC 39118^T törzsek képesek a vegyületet biomasszájukon adszorbeálni, míg a folyadék fázisú maradékanyag nem volt sejttoxikus a krónikus *Aliivibrio fischeri* tesztben.

7. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Dolgozatomban herbicid hatóanyagok, keverékek és készítmények ökotoxicitásának megismerésére, továbbá a hatóanyagok biológiai úton történő lebonthatóságára és detoxifikációjára fókuszáltam. A herbicidek közül a környezetben gyakori megjelenéssel rendelkező *glyphosate*-ot, *mesotrione*-t, *S-metolachlor*-t és *terbuthylazine*-t választottam ki.

A herbicidek sejttoxicitásának vizsgálatára akut *AVF* standard tesztet alkalmaztam. Megállapítottam, hogy a *terbuthylazine* nem, de az *S-metolachlor* és a *mesotrione* akut toxicitást eredményezett. Néhány kísérletes tanulmány már korábban vizsgálta ezen herbicidek mikrobiális ökotoxicitását akut Microtox[®] tesztben (BONNET *et al.* 2008, JOLY *et al.* 2013, KÖCK *et al.* 2010, OSANO *et al.* 2002, VILLA *et al.* 2012), vagy ezek keverékét [*mesotrione* + *S-metolachlor*] (CARLES *et al.* 2018), összehasonlítva azokat az általam kapott eredményekkel az *S-metolachlor* esetében jó egyezés volt megfigyelhető. Viszont a *terbuthylazine* esetében az irodalmi adatokkal szemben ellentmondásos eredményt kaptam (*terbuthylazine*: EC₅₀, irodalom= 41,07 mg/L (15 perc), EC₅₀, saját mérés= nem toxikus). A tapasztalt nagy különbségeknek számos oka lehet, hogy a szerzők (VILLA *et al.* 2012) 15 percig exponálták a tesztszervezetet 30 perc helyett. A *terbuthylazine*-hoz hasonlóan HÁHN és mtsai. (2017) arról számoltak be, hogy a rokonvegyülete, az *atrazine** nem okozott gátlást a biolumineszcenciában akut expozíció után, azonban krónikus *AVF* tesztet használva 10 és 15 óra expozíciót követően az EC₅₀ értékek 2,7 és 8,3 mg/L voltak. Felmerül a kérdés, hogy a szimmetrikus-triazinoknak a vizsgálatára mennyire alkalmas az akut *AVF* teszt. A két szimmetrikus triazin kémiai szerkezete csak az egyik alkil oldalláncban különbözik, mely szerkezeti hasonlóság összefüggésben lehet a megnövekedett, hosszú távú citotoxicitással. Ez azért is aggodalmat keltő, mert a globális felhasználásuk révén a *terbuthylazine* (főként az EU-ban, ahol az *atrazine** használata tiltott) és az *atrazine** (EU-n kívül) kiemelt helyet foglal el a peszticid-felhasználási trendekben, és rendkívül gyakran detektálhatók a talajban, a talaj- és a felszíni vizekben, sőt a csapadékban is (TASCA *et al.* 2018). A *mesotrione* és az *S-metolachlor* biolumineszcencia gátlást okozott mind az akut, mind a krónikus tesztben, bár a toxikus hatás az utóbbinál volt kifejezettebb, hasonlóan a *terbuthylazine*-hoz. A *mesotrione*, *S-metolachlor* és a *terbuthylazine* kombinációinak rövid-, és hosszú távú toxicitását [a *mesotrione* + *S-metolachlor* (1:1) kivételével Microtox[®] teszt alkalmazásával (CARLES *et al.* 2018)] először igazoltam. A nyolc keverék közül egy, a növényvédő szer forgalomban jelenleg is elérhető, engedéllyel rendelkező készítmény (Calaris Pro[®]) hatóanyag

tartalmával azonos mix volt a legtoxikusabb (*mesotrione* + *terbuthylazine* 1:6,5 arányú kombináció).

A hatóanyagok krónikus citotoxicitásának vizsgálatáról elmondható, hogy az *AVF*-re alkalmazott mikrotiter lemezes módszer, az akut teszttel szemben időtakarékosabb és időegység alatt nagyobb számú mintát lehet vele egyszerre vizsgálni. Az eredmények alapján a krónikus meghosszabbított idejű módszer érzékenysége jobbnak bizonyult (akár egy nagysádrenddel), mint a 30 perces szabvány szerinti akut teszté. Az *AVF* prokarióta tesztszervezetet alkalmazó krónikus bioteszt érzékeny és könnyen kivitelezhető vizsgálat, amely alkalmas a peszticidek hosszú távú, krónikus toxicitásának meghatározására. A krónikus teszt megnövekedett érzékenysége fontos eredmény a növényvédő szerek és keverékek ökológiai kockázatának pontosabb megállapításában. Míg az ökotoxikológiai vizsgálatok sokszor az akut hatásokra összpontosítanak, a krónikus, hosszútávú tesztek fényt deríthetnek a környezeti elemekben gyakran csak kis koncentrációban, de állandóan jelen lévő, folyamatos expozíciót jelentő peszticidek ökoszisztémára, illetve a hatásviselőit érő káros következményekre. A fentebb bemutatott előnyös tulajdonságai indokolják a krónikus *AVF* teszt rutinszerű felhasználását a gyakorlatban, könnyen meghonosítható lehetne az ökotoxikológiai vizsgálatok egyik elemeként. A jövőben hasznos lehet, mint előzetes és önálló, figyelmeztető, valamint értékelő vizsgálati módszer.

A peszticid-keverékek környezeti/ökológiai hatásainak becsléséhez prediktív modellek alkalmazása szükséges, ugyanis a különböző vegyületeket tartalmazó keverékekről ismert, hogy kölcsönhatásba lépnek a biológiai rendszerekkel oly módon, hogy nagymértékben módosítják az egyes vegyületek saját toxicitását. A közelmúltban számos tudományos ellentmondás és bizonytalanság merült fel a *Concentration Addition (CA)* és az *Independent Action (IA)* modelljeivel kapcsolatban. A KIM alkalmazásához nincs szükség a fizikai-kémiai kölcsönhatások ismeretére a keverékek átfogó együttes hatásainak értékeléséhez. További előny, hogy különböző biológiai hatásmechanizmusú, támadáspontú anyagok is értékelhetők a módszer segítségével. Ezenkívül a KIM lehetővé teszi tetszőleges számú vegyületből álló keverék hatásainak elemzését, miközben a vegyi anyagok különböző arányait/koncentrációit is figyelembe vesszük (BELDEN *et al.* 2007, BELDEN & LYDY 2006, CEDERGREEN & STREIBIG 2005, CEDERGREEN *et al.* 2008, CHOU 2006, LEBLANC *et al.* 2012, TEUSCHLER 2007, YANG *et al.* 2017). A peszticidek együttes hatásainak legnagyobb adatbázisát BELDEN és mtsai. (2007) 207 peszticid-keverékről alkotta meg: a *mesotrione*, az

S-metolachlor és a *terbuthylazine* megtalálható az adatbázisban, ellenben ezek keverékeikről nincs adat. A gyomirtószer-keverékek együttes, az *AVF* tesztstruktúrára antagonistá, additív vagy szinergista hatással rendelkeztek, melyet elsőként publikáltam. BELDEN és mtsai. (2007) szerint a keverék-vizsgálatokat csak tiszta anyagok felhasználásával lehet elvégezni, mivel a termékek összetétele befolyásolhatja az eredményeket. Azonban a hatóanyagok mellett számos más vegyület (felületaktív anyag, formázószer, segédanyag, adalékanyag [adjuváns]) is jelen van a környezetben, ezért elengedhetetlen a kereskedelmi forgalomban lévő növényvédő szerek biológiai hatásainak tanulmányozása. Ezenkívül további vizsgálatok is szükségesek a herbicid bomlástermékek citotoxicitásának felmérésére, amelyek lényegesen toxikusabbak lehetnek, mint az anyavegyületek.

A *glyphosate*-alapú herbicidek káros biológiai hatásait számos tanulmányban közölték, ennek ellenére a témához továbbra is tisztázásra váró ellentmondások tapadnak. Magyarországon először vizsgáltam olyan, III. forgalmi kategóriájú, azaz szabadon hozzáférhető növényvédő szer készítmény-csoportot, amelynek „inaktív”, sok esetben ismeretlen összetevői miatt is kétes, illetve aggályos a toxikológiai/ökotoxikológiai megítélése. A kiválasztott, különböző formázó-, segédanyagokat és *glyphosate*-sót tartalmazó készítmények Magyarországon és az EU-ban engedéllyel rendelkeznek (11 készítmény), kivéve a POE(15)-öt tartalmazó Roundup® Classic-ot és a Gladiátor 480 SL®-t. A POEA segédanyag tartalmú *glyphosate* készítmények alkalmazása az EU-ban 2016 óta tilos a POEA toxicitása miatt. Azóta számos készítmény szabadon elérhető más segédanyagokkal formázva. Vizsgálataim során a vizsgált tizenegy szabadforgalmú, POE(15)-mentes készítményre összpontosítottam, amelyek legtöbbje akut és krónikus citotoxicitást (*AVF* tesztek), valamint közvetlen ösztrogén és androgén hatást mutatott (BLYES és BLYAS tesztek), míg a *glyphosate*-sav aktív hatóanyag hatástalannak bizonyult az alkalmazott biotesztekben. Elsőként közöltem *in vitro* eredményeket a POE(15) nélküli *glyphosate*-alapú készítmények akut és krónikus citotoxicitásáról *Aliivibrio fischeri* ökotoxikológiai tesztorganizmusra nézve, valamint közvetlen ösztrogén és androgén hatásaikról a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő alapú tesztrendszerrel vizsgálva. A Barclay Gallup Biograde 360®, a Fozát 480® és a Total® készítményeket vizsgálva a citotoxicitásuk mellett a Total® ösztrogén aktivitást váltott ki, míg ösztrogén és androgén aktivitást a Fozát 480®. Az aktív hatóanyag mindhárom készítményben a *glyphosate* IPA-sója, ezzel szemben segédanyagok egyikükben sem deklaráltak. Kapcsolatot nem sikerült megállapítanom a biológiai hatások és a *glyphosate*-só típusa vagy koncentrációja között. Ebből arra lehet következtetni, hogy a

citotoxicitás és a hormonális aktivitás a készítményekben megtalálható segédanyagokkal kapcsolható össze.

Megállapításaim szerint mind a tizenhárom vizsgált készítmény citotoxikus és közülük tíznek közvetlen hormonális aktivitása is van az ajánlott mezőgazdasági és kiskerti alkalmazási koncentrációknál legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb hígításban is, vagy a 0,5%-os koncentrációban, amelyet alkalmazásuk után felszíni vizekben is kimutattak (CASSAULT-MEYER *et al.* 2014, TELEKEN *et al.* 2019). A legmarkánsabb hormonálisan aktív hatásokat 0,5%-os koncentrációszint alatt, több esetben egy nagyságrenddel alacsonyabb mértékben váltották ki. A legkifejezettebb toxicitást a szórófejes palackban forgalomba hozott, hígítás nélkül közvetlenül alkalmazandó Glialka Express 6H[®] esetében mutattam ki, amely a legkisebb hatóanyag-tartalmú (1% IPA-só) a vizsgált készítmények között. Azonban ez az egyetlen olyan készítmény, amelyben 2%-ban a pelargonsav és „egyéb zsírsavak”, valamint 1,5%-ban azonosítatlan felületaktív anyag is található. A pelargonsav, más néven nonánsav, természetes körülmények között előfordul növényekben és állatokban, és független herbicid hatóanyagként is forgalomba kerül. Növényeken alkalmazva deszikkálja azok zöld szöveit, gyors és nem-szelektív elszáradást eredményezve. Alacsony akut toxicitása van emlősökre és madarakra vonatkoztatva, halakra és kétélűekre enyhén mérgező hatású, mivel azonban antimikrobiális (főleg gombaellenes) szerként használják élelmiszer-tartósításban, gátolja a mikroorganizmusok, különösen a gombák szaporodását alacsony koncentrációban [0,04 mg/L] (MMWD 2010), ami hozzájárulhat a Glialka Express 6H[®] megfigyelt, igen jelentős toxicitásához.

A vegyi anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról (CLP) szóló 1272/2008/EK rendelet víz-veszélyességi besorolása szerint a „H411 mérgező a vízi élővilágra hosszan tartó károsodást okoz, krónikus vízi toxicitás 2. osztályába” 13 készítményből 11, a „H412 ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz, krónikus vízi toxicitás 3. osztályába” kettő (Dominátor Extra 608 SL[®], Total[®]) sorolható a biztonságtechnikai adatlapjuk (MSDS) szerint. Több esetben a készítmények környezeti veszélyeit a hatóanyag osztályozása és koncentrációja határozza meg. Azonban a tudományos eredmények alapján a *glyphosate* nem karcinogén, mutagén vagy endokrin rendszert károsító vegyület, a készítményeknél nem határoztak meg ilyen biológiai hatásokat – így a készítmények összetevőit a szabályozási adatok alapján nem osztályozzák. Öt készítményben három segédanyag, név szerint az etoxilált hidrogénezett zsírsavamin (Glyphos Dakar[®]), etoxilált éter-alkilamin (Glialka Star[®], Roundup[®] Mega), POE(15) (Gladiátor 480 SL[®], Roundup[®] Classic), melyeket a vízi élővilágra toxikus

anyagokként azonosítottak. További, a formázóanyagokra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre. Eredményeim alapján a krónikus *AVF* kísérletekből származó EC_{50} értékeket összehasonlítottam az MSDS-ben található más, vízi élőlényekére meghatározottal. A *Daphnia magna* esetében figyelemre méltó különbségeket lehetett megállapítani: az *AVF* által mért EC_{50} -értékek egy- és két nagyságrenddel alacsonyabbak voltak, mint a *Daphnia magna* 48 órás vizsgálatban a következő készítmények esetében: Barclay Gallup Biograde 360[®], Boom Efekt[®], Fozát 480[®], Gladiátor 480 SL[®], Glialka Express 6H[®], Glyphos Dakar[®], Medallon Premium[®], Total[®] (M11. melléklet).

A *glyphosate* hatóanyagot herbicidként történő felhasználásra az Európai Unióban 2022. december 15-ig engedélyezik. Megújítás céljából, a *Glyphosate*-megújítási csoport (GRG - Glyphosate Renewal Group) jóváhagyási kérelmet küldött a *Glyphosate*-értékelő csoportnak (AGG – Assessment Group on Glyphosate), a többi tagállamnak, az EFSA-nak és az Európai Bizottságnak 2019. december 12.-én. A jogi aktus előkészítésével hivatalosan megindult a megújítási folyamat és a benyújtás teljes dosszióját 2021. június 15-ig kellett megküldeni az EFSA-nak és az ECHA-nak. Az AGG, melynek Magyarország is tagja (Franciaország, Hollandia és Svédország mellett), megállapodott abban, hogy részese lesz egy átfogó tudományos értékelési folyamatnak, figyelembe véve a tudomány és a technológia fejlődését, valamint a hatóanyag legutóbbi felülvizsgálata óta szerzett tapasztalatokat. Az AGG tagállamai 2021. június 15.-én kiadott közleményben, arra a következtetésre jutottak, hogy a *glyphosate* nem jelent kockázatot az emberi egészségre. A növényvédőszer-hatóanyag újra-engedélyezési eljárások során az EU tagállamok csak akkor engedélyezhetik peszticid-készítmény forgalomba kerülését, ha annak hatóanyaga az EU-ban jóváhagyott. Amennyiben magának a hatóanyagnak az engedélyét megújították, akkor készítmény esetében is így kell eljárni (AGG 2021). Az eredményeim rámutatnak arra, hogy az aktív hatóanyagon túl az azt tartalmazó összetett készítmények felülvizsgálata sem maradhat el.

Tudományos dolgozatom eredményei azt mutatják, hogy a *glyphosate* a legkevésbé toxikus vegyület *glyphosate*-alapú készítményekben, mindazonáltal az „új-generációs” formázószeresek és segédanyagok toxikológiai értelemben nem inerteek, valamint nem kizárható, hogy a hatóanyag és köztük szinergista hatások lépnek fel. A növényvédőszer-hatóanyagok és készítmények ökotoxikológiai vizsgálata mellett a formázóanyagok toxicitásának meghatározása is nélkülözhetetlen. Elengedhetetlen a *glyphosate*-alapú készítményekben alkalmazott segédanyagok egészségre és környezetre gyakorolt káros és kumulatív hatásainak megértése az

átfogóbb kockázatértékelés érdekében, értékelési protokolljaik frissítése (lehetséges karcinogenitás, endokrin diszruptor hatások), illetve a szabad hozzáférhetőségük felülvizsgálata is sürgetően fontos feladat.

Az aerob biodegradációban vizsgált 99 baktériumtörzs közül csak egy volt képes az *S-metolachlor* szinte teljes lebontására, ami arra enged következtetni, hogy még a kedvező és kontrollált laboratóriumi körülmények között is nehéz a vegyületek biológiai átalakítása. A hatóanyagok degradációjában résztvevő nemzetség sikere (*Streptomyces* genus) – az **5.2 fejezetben** bemutatott, a szakirodalomban eddig leírt - genetikai hátterével összefüggésbe hozható, katabolikus/metabolikus tulajdonságoknak is köszönhető.

A *terbuthylazine* *Rhodococcus*-ok pelletén való kötődésének ténye érdekes új tudományos megállapítás. A szakirodalmat áttekintve nem találtam utalást a nemzetség képviselőinek sejtfalán kötődni képes *terbuthylazine* jelenségére. HÁHN JUDIT (2017) doktori disszertációjában vizsgálva az *atrazine** *Rhodococcus*-ok biomasszájában történt adszorpcióját, elhanyagolható mennyiséget detektált. A vegyületek kémiai hasonlóságában való kismértékű eltérés nagy különbségeket eredményezhet a molekulák mikrobiális sejteken történő megkötődésében, melynek a nyomon követése és jövőbeni *in vitro* vizsgálata kulcsfontosságú feladat. Feltételezésem szerint a *Rhodococcus*-ok biodegradációs tevékenységét nagyban befolyásolta a *terbuthylazine*-kötődési jelenség a baktérium pelleten.

Az oxigénlimitált körülmények között vizsgált biodegradáció nem vezetett pozitív eredményhez. Az *S-metolachlor* alacsony oxigén-koncentráció ($\leq 0,5$ mg/L) jelenléte mellett perzisztensnek, nehezen bonthatónak bizonyult. Az aerob módon eredményesen degradáló mikroba mikroaerob állapotok között már nem volt képes a vegyület bontására, ami a másodlagos perzisztencia jelenségére utal.

A jövőben célszerű lehet olyan mikroaerob/anaerob izolációs és dúsítási technikák fejlesztése is, amivel meghatározhatóak lehetnek a potenciálisan biodegradációra, így a másodlagos perzisztencia enyhítésére képes mikrobák. A szennyező anyag bontását katalizáló enzimeket kódoló gének jelenléte és előfordulási gyakorisága a legközvetlenebb predikciója lehet a mikrobák biodegradációs képességének. Az egyes kromoszomális vagy extrakromoszomális (plazmidhoz kötött) funkciógének vizsgálatára a modern molekuláris biológiai eszközökkel nyílhat lehetőség. A degradációs képességek pontos feltérképezésére és megértésére tökéletes alapot szolgáltathatnak a genomszekvenálási és génexpressziós vizsgálatok.

A kémiai-analitikai úton alátámasztott biodegradációt a mikroorganizmusok által képzett bontási maradékanyagok citotoxicitásának mérése követte: az *S-metolachlor*-t eredményesen degradáló törzs sikeresen biodetoxifikálta azt.

Kutatómunkám folytatásaként további figyelmet kell fordítani a peszticid-hatóanyag koktélok vizsgálatán túl a formázó- és segédanyagok, valamint a peszticid készítmények (ideértve az engedélyköteles I. és II. forgalmi kategóriájú szereket is) átfogó biológiai és toxikológiai értelemben vett hatásainak megismerésére és biodetoxifikálhatóságuk vizsgálatára.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori kutatómunkám első fázisában három, kereskedelmi forgalomban kapható készítményekben együttesen is alkalmazott, különböző hatásmechanizmusú herbicid hatóanyag (*mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*) és a belőlük alkotott nyolc keverék rövid és hosszú távú citotoxicitását határoztam meg szabvány szerinti, akut Microtox[®] *Aliivibrio fischeri* (*AVF*) biolumineszcencia gátlási teszt és meghosszabbított, 25 órás kontaktidejű krónikus változatának alkalmazásával. Ezen hatóanyagok (öko)toxicitása, szennyezőképessége, szerforgalma és környezeti megjelenése magas prioritású az EU-ban és világszerte. A *mesotrione* és az *S-metolachlor* 30 perces expozíciója viszonylag alacsony akut toxicitást eredményezett ($EC_{50, 30\text{perc}} = 118$ és 265 mg/L), míg a *terbuthylazine* egyáltalán nem okozott biolumineszcencia gátlást. A krónikus *AVF* alapú bioteszt a hatóanyagok és kombinációs keverékek esetében számos esetben jelentősen érzékenyebbnek bizonyult - akár egy nagyságrenddel is - mint a rövid távú, szabványos teszt. A *mesotrione* toxicitásában nem tapasztaltam szignifikáns különbséget az akut és krónikus teszt eredményei között. A hatóanyagok közül a *terbuthylazine* ($EC_{50, 10\text{óra}} = 4,9$ mg/L; $EC_{50, 15\text{óra}} = 9,6$ mg/L), a keverékek közül a *mesotrione* + *terbuthylazine* 1:6,5 arányú kombinációja ($EC_{50, 10\text{óra}} = 16,4$ mg/L; $EC_{50, 15\text{óra}} = 19,5$ mg/L) váltotta ki a legnagyobb sejttoxikus hatást.

Munkám során az aktív hatóanyagok kombinációi által kiváltott együttes hatásokat a KIM segítségével határoztam meg, ugyanis a rendelkezésre álló adatbázisok hiányosak ebből a szempontból. Az EC_{50} értékek alapján, mindegyik keverék együttes szinergista hatást mutatott az akut tesztben. Azonban a krónikus tesztben az összes keverék antagonistá válassz eredményezett a *mesotrione* és az *S-metolachlor* (arány 1:1) kivételével, amelynek 10 és 15 órás expozíció után additív és szinergista hatása volt az akut teszthez hasonlóan. Eredményeim értékes adatokat szolgáltatnak mind az aktív herbicid anyagok, mind a keverékek rövid- és hosszú távú sejttoxicitásáról, valamint együttes hatásait értékelve, segíthetik és alátámaszthatnak egy pontosabb és megbízhatóbb kockázatértékelési folyamatot.

Doktori munkám következő szakaszában a világszerte ismert és legnagyobb mennyiségben alkalmazott *glyphosate*, bomlásterméke az AMPA, illetve a hatóanyagot tartalmazó komplex peszticid készítmények és egy formázóanyaguk a [POE(15)] tudományos közleményekben gyakran vitatott toxikus, hormonrendszert zavaró hatásait vizsgáltam. Az akut és krónikus sejttoxicitásuk felderítésére az *AVF* tesztszervezetet alkalmaztam, direkt hormonális aktivitásuk

meghatározására a genetikailag módosított élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) alapú BLYAS/BLYES törzseket, illetve a hozzájuk tartozó, toxicitást mérő BLYR törzset. A direkt hormonális aktivitást mérő komplex bioripporter tesztrendszerrel először mutattam ki, hogy (jelenleg is használt) *glyphosate*-alapú készítmények direkt hormonhatást váltanak ki. Megállapítottam, hogy a *glyphosate* önmagában nem, de a komplex készítmények (hatóanyag és a benne lévő formázó- és segédanyagok) képesek *in vitro* citotoxikus és ED hatások kiváltására. A biológiai hatások összekapcsolhatók a segédanyagok jelenlétével, melyek vizsgált 13 készítményből háromban nincsenek deklaráva.

Kutatásaim során négy hatóanyag (*glyphosate*, *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine*) mikrobiális úton történő, oxigénnel ellátott (aerob) és oxigénszegény (mikroaerob) körülmények között zajló lebonthatóságát is vizsgáltam, olyan szennyezett vagy mesterségesen elszennyezett környezeti elemekből izolált baktériumokkal, amelyek sikeres adaptációjuk révén képesek lehetnek metabolikus folyamataikkal eliminálni a herbicid molekulákat. Összesen 20 különböző nemzetséghez sorolható 36 mikrobafaj 45 törzsét, valamint a *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó típus törzsgyűjtemény 44 fajtát alkalmaztam a biodegradációs vizsgálataimban. A vizsgált baktériumfajok a *glyphosate*, *mesotrione* és a *terbuthylazine* aerob lebontására nem voltak képesek. A *terbuthylazine* három *Rhodococcus* típus törzs általi bioadszorpcióját (~40-65%) és a *Streptomyces caniferus* K176 törzs kiváló *S-metolachlor* bontó képességét (~95%) elsőként állapítottam meg. A vizsgált négy törzs maradékanyagainak citotoxicitása megszűnt. Mikroaerob biodegradációt nem sikerült megállapítanom.

Tudományos doktori munkám elősegíti a *mesotrione*, *S-metolachlor*, *terbuthylazine* keverékek együttes citotoxikus hatásainak megismerését és kiemeli a koktélnyilvánosságok vizsgálatának szükségességét. Fontos információkat közöl a *glyphosate*-alapú készítmények *in vitro* direkt ED hatásairól, valamint az ökoszisztémát és az emberi egészséget veszélyeztető kockázatairól, hangsúlyozva a peszticid készítmények kiterjedtebb toxikológiai értékelésének szükségességét. Lehetővé teszi a peszticid hatóanyagok bakteriális degradálhatóságának és detoxifikálhatóságának pontosabb megítélését.

9. ENGLISH SUMMARY

In the first period of my PhD research, I determined the short- and long-term cytotoxicity of three active ingredients of herbicides (mesotrione, S-metolachlor, terbuthylazine) with different modes of actions and their eight mixtures using the standard acute Microtox[®] *Aliivibrio fischeri* (*AVF*) bioluminescence inhibition assay and its chronic version (prolonged contact time of 25 hours). The (eco)toxicity, polluting potential, distribution, and environmental fate of these active substances are of high priority in the EU and worldwide and have played a major role in the formulation of my objectives. 30 minutes exposure of mesotrione and S-metolachlor resulted in relatively low acute toxicity ($EC_{50, 30 \text{ minutes}} = 118$ and 265 mg/L), while terbuthylazine did not result in bioluminescence inhibition at all. Compared to the acute test, the chronic *AVF*-based bioassay proved to be significantly more sensitive, by up to one order of magnitude, for several substances and their mixtures. However, no significant difference in toxicity of mesotrione was observed between the acute and chronic assay results. In the chronic assay, terbuthylazine ($EC_{50, 10\text{hours}} = 4.9 \text{ mg/L}$; $EC_{50, 15\text{hours}} = 9.6 \text{ mg/L}$) and the combination of mesotrione + terbuthylazine in a 1:6.5 ratio ($EC_{50, 10\text{hours}} = 16.4 \text{ mg/L}$; $EC_{50, 15\text{hours}} = 19.5 \text{ mg/L}$) produced the highest cytotoxicity.

To fulfil my second objective, the combined effects of the active substance combinations were classified using the CIM, as the available databases are incomplete in this regard. Based on the EC_{50} values, each mixture showed synergistic effects in the acute test. However, in the chronic test, all mixtures produced antagonistic responses except mesotrione + S-metolachlor combination (ratio 1:1), which had additive and synergistic effects after 10 and 15 hours of exposure, respectively, similarly to the acute test. My results provide valuable data on the short- and long-term cytotoxicity of both active substances and their mixtures, and evaluating their combined effects, may help and support a more accurate and reliable risk assessment process.

In the next stage of my doctoral research, I investigated the controversial toxicity and endocrine-disrupting effects of the most widely used glyphosate, its degradation product AMPA, and complex glyphosate-based formulations including two products containing the nowadays banned formulant POE(15). *AVF* test organism was used to investigate their acute and chronic cytotoxicity, and the genetically modified yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) BLYAS/BLYES strains were applied to determine their direct hormonal activity while toxicity was checked in parallel using BLYR strain. The direct estrogen and/or androgen receptor binding activity of approved glyphosate-based herbicides was demonstrated for the first time. Glyphosate as a pure

substance was not toxic, although the formulations containing the active ingredient and co-formulants (occasionally not even declared), resulted in acute and chronic cytotoxicity and endocrine-disrupting effects. Toxicity and hormonal activity may be linked to the co-formulants, which are not declared in three of the studied 13 glyphosate-based formulations.

The next aim was to investigate the microbial degradation of the four active substances (glyphosate, mesotrione, S-metolachlor, terbuthylazine) under oxygenated (aerobic) and oxygen-limited (microaerobic) conditions, using microorganisms that were isolated from contaminated or artificially polluted environmental compartments, expecting that they are able to effectively adapt their metabolic processes to degrade the herbicide molecules. In total 45 strains, belonging to 36 different species in 20 genera, and 44 species of the type strain collection of the genus *Rhodococcus* were used in the biodegradation experiments. Bacterial strains were not able to biodegrade aerobically glyphosate, mesotrione and terbuthylazine. For the first time under aerobic conditions described that terbuthylazine was found to adsorb (~40-65%) by three *Rhodococcus* strains, while *Streptomyces caniferus* strain K176 was able to degrade S-metolachlor with excellent capacity (~95%). All four strains tested were able to cease the cytotoxicity of their end-products. Under microaerobic conditions, biodegradation was not detected.

In summary, the dissertation contributes to the understanding of the combined cytotoxic effects of mesotrione, S-metolachlor, terbuthylazine mixtures, and highlights the need for cocktail-effect studies. It provides important information on the cytotoxic and direct endocrine-disrupting effects of glyphosate-based formulations *in vitro* and their risks to ecosystems and human health, emphasizing the need for a more extensive (eco)toxicological evaluation of pesticide formulations and co-formulants. The work also provides more accurate information on the aerobic and microaerobic biodegradation and biodetoxification of active substances of pesticides.

10. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

(HTTP1) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>

(HTTP2) <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/373.htm>

(HTTP3) <https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/kereso>

(HTTP4) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminomethyl_phosphonic-acid

(HTTP5) <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/842.htm>

(HTTP6) <https://www.sielc.com/mesotrione.html>

(HTTP7) <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/49085?lang=hu®ion=HU>

(HTTP8) <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/45678?lang=hu®ion=HU>

(HTTP9) <https://lpsn.dsmz.de/genus/olivibacter>

(HTTP10) <https://lpsn.dsmz.de/genus/paenarthrobacter>

1107/2009/EK (2009): Az Európai Parlament és a Tanács 1107/2009/EK Rendelete (2009. október 21.) a növényvédő szerek forgalomba hozataláról, valamint a 79/117/EGK és a 91/414/EGK tanácsi irányelvek hatályon kívül helyezéséről. Az Európai Unió Hivatalos Lapja. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=hu>

ABBES, C., MANSOURI, A., WERFELLI, N., LANDOULSI, A. (2018): Aerobic Biodegradation of DDT by *Advenella Kashmirensis* and Its Potential Use in Soil Bioremediation. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 27:6, 455-468. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1485629>

AKI - AGRÁRGAZDASÁGI KUTATÓ INTÉZET (2017): Statisztikai Jelentések - Növényvédő szerek értékesítése, 2016. XVI. évfolyam 1. szám, Budapest.

ALTAMIRANO, G., A., DELCONTE, M., B., GOMEZ, A., L., INGARAMO, P., I., BOSQUIAZZO, V., L., LUQUE, E., H., MUÑOZ-DE-TORO, M., KASS, L. (2018): Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118:111–118. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.011>

AL-THANI, R.F., ABD-EL-HALEEM, D., A., M. AND AL-SHAMMARI, M. (2009): Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. *African Journal of Microbiology Research*, 3:11, 761-766. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000454>

AMALRIC, L., BARAN, N., COUREAU, C., MAINGOT, L., BURON, F., ROUTIER, S. (2013): Analytical developments for 47 Pesticides: first Identification of neutral chloroacetanilide derivatives in French groundwater. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93:15, 37–41. <https://doi.org/10.1080/03067319.2013.853758>.

- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M., R., MARTÍNEZ, M., A., CASTELLANO, V., J., MARTÍNEZ, MARTIN, M., T., NOZAL, M., J., BERNAL, J., L. (2009): Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicology Letters*, 190, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.008>.
- ANDREONI, V., CAVALCA, L., RAO, M., A., NOCERINO, G., BERNASCONI, S., DELL'AMICO, E., COLOMBO, M., GIANFREDA, L. (2004): Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, 57:5, 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.013>
- ARAUJO, A., S., F., MONTEIRO, R., T., R. & ABARKELI, R., B. (2003): Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52:5, 799–804. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00266-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00266-2)
- ARORA, P., K., SASIKALA, C., RAMANA, C., V. (2012): Degradation of chlorinated nitroaromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 2265–2277. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3927-1>
- ARORA, S., SAINI, H.S., SINGH, K. (2011): Effect of dye structure on the decolorisation efficiency of *Candida tropicalis* and *Bacillus firmus*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 2:5, 1-4. ISSN: 2155-6199.
- AGG – ASSESSMENT GROUP ON GLYPHOSATE (2021): Procedure and outcome of the draft Renewal Assessment Report on glyphosate, June 2021. https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-06/pesticides_aas_agg_report_202106.pdf
- BACKHAUS, T., FROEHNER, K., ALTENBURGER, R., GRIMME, L., H. (1997): Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. *Chemosphere*, 35:12, 2925-2938. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00340-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00340-8)
- BACOSA, H., P. & INOUE, C. (2015): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 689-697. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.068>
- BAE, H., S., LEE, J., M., LEE, S.-T. (1996): Biodegradation of 4-chlorophenol via a hydroquinone pathway by *Arthrobacter ureafaciens* CPR706. *FEMS Microbiology Letters*, 145:1, 125-129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08566.x>
- BAI, Y., SUN, Q., ZHAO, C., WEN, D., TANG, X. (2008): Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a *Paracoccus* sp. strain BW001. *Biodegradation*, 19, 915-926. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9193-3>
- BALÁZS, A., KRIFATON, CS., RISA, A., CSERHÁTI, M., KUKOLYA, J., TÓTH, Á., HÁHN, J., SZOBOSZLAY, S., ELDRIDGE, M., WANG, J., KRISZT, B. (2014): Biodegradation of 5 α -dihydrotestosterone to non-androgenic products. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 162-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.008>
- BALTHAZOR, T., M. & HALLAS, L., E. (1986): Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 432–434.
- BARAN, N. & GOURCY, L. (2013): Sorption and mineralization of S-metolachlor and its ionic metabolites in soils and vadose zone solids: consequences on groundwater quality in an alluvial aquifer (Ain Plain, France). *Journal of Contaminant Hydrology*, 154, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.07.009>.

- BARCANSKA, H., SAJDAK, M., SZCZYPKA, K., SWIENTEK, A., TWOREK, M., KUREK, M. (2017): Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:644-658. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7798-3>
- BARCANSKA, H., KLUZA, A., KRAJCZEWSKA, K., MAJ, J. (2016): Degradation study of mesotrione and other triketone herbicides on soils and sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 16, 125-133. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1188-1>
- BARCANSKA, H., RUSEK, M. & SZATKOWSKA, A. (2012): New procedures for simultaneous determination of mesotrione and atrazine in water and soil. Comparison of the degradation processes of mesotrione and atrazine. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 321–334. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-1970-5>
- BASUKI, W. (2017): Biodegradation of Used Synthetic Lubricating Oil by *Brevundimonas diminuta* AKL 1.6. *Makara Journal of Science*, 21:3, 136-142. <https://doi.org/10.7454/mss.v21i3.7382>
- BATISSON, I., CROUZET, O., BESSE-HOGGAN, P., SANCELME, M., MANGOT, J.-F., MALLET, C., BOHATIER, J. (2009): Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environmental Pollution*, 157:4, 1195-1201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.009>
- BATISSON, I., SANCELME, M., MALLET, C. & BESSE-HOGGAN, P. (2010): Fate and environmental impact of the recently marketed herbicide Mesotrione: coupling biological and chemical studies for a global overview. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.) - *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Microbiology Book Series – No. 2. Formatex Research Center (Spain) p. 287-294
- BATTAGLIN, W., A., FURLONG, E., T., BURKHARDT, M., R., PETER, C., J. (2000): Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of The Total Environment*, 248:2-3, 123-133. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00536-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00536-7)
- BAUMANN, B., SNOZZI, M., ZEHNDER, A., J., B., VAN DER MEER, J., R. (1996): Dynamics of Denitrification Activity of *Paracoccus denitrificans* in Continuous Culture during Aerobic-Anaerobic Changes. *Journal of Bacteriology*, 178:15, 4367-4374.
- BEDADE, D., K. & SINGHAL, R., S. (2018): Biodegradation of acrylamide by a novel isolate, *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: Identification and characterization of the acrylamidase produced. *Bioresource Technology*, 261, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.012>
- BELDEN, J., B. & LYDY, M., J. (2006): Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:2, 623–629. <https://doi.org/10.1897/05-370R.1>
- BELDEN, J., B., GILLIOM, R., J., LYDY, M., J. (2007): How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3:3, 364–372. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630030307>
- BENACHOUR, N. & SÉRALINI, G. (2009): Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22:97–105. <https://doi.org/10.1021/tx800218n>

- BENBROOK, C. M. (2019): How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environmental Sciences Europe*, 31:2 <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0184-7>.
- BENBROOK, C., M. (2016): Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- BENHAMED, S., GUARDIOLA, F., A., MARS, M., ESTEBAN, M., Á. (2014): Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*, 171:1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.008>
- BENIMELI, C., S., AMOROSO, M., J., CHAILE, A., P., CASTRO, G., R. (2003): Isolation of four aquatic streptomycetes strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Bioresource Technology*, 89:2, 133-138. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00061-0)
- BÓKONY, V., VEREBÉLYI, V., UJHEGYI, N., MIKÓ, ZS., NEMESHÁZI, E., SZEDERKÉNYI, M., ORF, S., VITÁNYI, E., MÓRICZ, Á., M. (2020): Effects of two little-studied environmental pollutants on early development in anurans. *Environmental Pollution*, 260, 114078. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114078>
- BOLDRIN, A., LANGONE, L., MISEROCCHI, S., TURCHETTO, M., ACRI, F. (2005): Po River plume on the Adriatic continental shelf: Dispersion and sedimentation of dissolved and suspended matter during different river discharge rates. *Marine Geology*, 222–223, 135–158. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2005.06.010>
- BONNET, J., L., BONNEMOY, F., DUSSER, M., BOHATIER, J. (2008): Toxicity Assessment of the Herbicides Sulcotrione and Mesotrione Toward Two Reference Environmental Microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 55:576-583. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9145-2>
- BOROWIK, A., WYSZKOWSKA, J., KUCHARSKI, J., BAĆMAGA, M., TOMKIEL, M. (2017): Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 1910-1925. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7919-z>
- BOTTA, F., LAVISON, G., COUTURIER, G., ALLIOT, F., MOREAU-GUIGON, E., FAUCHON, N., GUERY, B., CHEVREUIL, M., BLANCHOU, H. (2009): Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere*, 77:1, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.008>
- BOTTONI, P., GRENNI, P., LUCENTINI, L., CARACCILO, A., B. (2013): Terbuthylazine and other triazines in Italian water resources. *Microchemical Journal*, 107, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.011>
- BRADBERRY, M., S., PROUDFOOT, T., A. AND VALE, A., J. (2004): Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3): 159-167. <https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00003>
- BRAUS, G., H. (1991): Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiological Reviews*, 55: 349–370. <https://doi.org/10.1128/membr.55.3.349-370.1991>
- BROSNAN, J., T., KOPSELL, D., A., ELMORE, M., T., BREEDEN, G., K., ARMEL, G., R. (2011): Changes in ‘Riviera’ Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] Carotenoid Pigments after Treatment

- with Three p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase-inhibiting Herbicides. *HortScience*, 46(3): 493-498 <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.3.493>
- BUSER, H.-R., POIGER, T., MÜLLER, M., D. (2000): Changed enantiomer composition of metolachlor in surface water following the introduction of the enantiomerically enriched product to the market. *Environmental Science and Technology*, 34:13, 2690–2696. <https://doi.org/10.1021/es0000201>
- BUSSE, H.-J. (2016): Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 9-37. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000702000702>
- CAI, P.-J., XIAO, X., HE, Y.-R., LI, W.-W., CHU, J., WU, C., HE, M.-X., ZHANG, Z., SHENG, G.-P., LAM, M., H.-W., XU, F., YU, H.-Q. (2012): Anaerobic biodecolorization mechanism of methyl orange by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1769-1776. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3508-8>
- CAMPOS, M., PERRUCHON, C., VASILIEIADIS, S., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U., KARPOUZAS, D., G., DIEZ, M., C. (2015): Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.009>
- CARACCILOLO, A., B, GIULIANO, G., GRENNI, P., CREMISINI, C., CICCOLI, R., UBALDI, C. (2005): Effect of urea on degradation of terbuthylazine in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24:5, 1035–1040. <https://doi.org/10.1897/04-253R.1>
- CARACCILOLO, A., B, FAJARDO, C., GRENNI, P., SACCÁ, M., L., AMALFITANO, S., CICCOLI, R., MARTIN, M., GIBELLO, A. (2010): The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. *FEMS Microbiology Ecology*, 71:1, 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00787.x>
- CARAFI, R., WOLLGAST, J., CANUTI, E., LIGTHART, J., DUERI, S., HANKE G., EISENREICH, S., J., VIAROLI, P., ZALDÍVAR, J., M. (2007): Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere*, 69:10, 1625–1637. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.060>
- CARDINALI, A., OTTO, S., ZANIN, G. (2013): Herbicides runoff in vegetative filter strips: evaluation and validation of a recent rainfall return period model. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93, 1628–1637. <https://doi.org/10.1080/03067319.2013.841151>.
- CARLES, L., JOLY, M., BONNEMOY, F., LEREMBOURE, M., DONNADIEU, F., BATISSON, I., BESSE-HOGGAN, P. (2018): Biodegradation and toxicity of a maize herbicide mixture: mesotrione, nicosulfuron and S-metolachlor. *Journal of Hazardous Materials*, 354, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.045>
- CARLES, L., JOLY, M., JOLY, P. (2017): Mesotrione Herbicide: Efficiency, Effects, and Fate in the Environment after 15 Years of Agricultural Use. Review. *Clean - Soil Air Water*, 45:9, 1700011. <https://doi.org/10.1002/clen.201700011>

- CASSAULT-MEYER, E., GRESS, S., SÉRALINI, G., É., GALERAUD-DENIS, I. (2014): An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38:131–140. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.007>
- CEDERGREEN, N. & STREIBEG, J., C. (2005): Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1676–1683. <https://doi.org/10.1897/04-362R.1>
- CEDERGREEN, N. (2014): Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLOS One*, 9:5, e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- CEDERGREEN, N., CHRISTENSEN, A., M., KAMPER, A., KUDSK, P., MATHIASSEN, S., K., STREIBEG, J., C., SØRENSEN, H. (2008): A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:7, 1621–1632. <https://doi.org/10.1897/07-474.1>
- CERQUEIRA, V., S., HOLLENBACH, E., B., MABONI, F., CAMARGO, F., A., O., PERALBA, M., D., C., R., BENTO, F., M. (2012): Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:3, 1203-1222. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0923-z>
- CHEN, S., CHANG, C., DENG, Y., AN, S., DONG, Y., H., ZHOU, J., HU, M., ZHONG, G., ZHANG, L., H. (2014): Fenpropathrin Biodegradation Pathway in *Bacillus* sp. DG-02 and Its Potential for Bioremediation of Pyrethroid-Contaminated Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:10, 2147–2157. <https://doi.org/10.1021/jf404908j>
- CHEN, S., DONG, Y., H., CHANG, C., DENG, Y., ZHANG, X., F., ZHONG, G., SONG, H., HU, M., ZHANG, L.-H. (2013): Characterization of a novel cyfluthrin-degrading bacterial strain *Brevibacterium aureum* and its biochemical degradation pathway. *Bioresource Technology*, 132, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.002>
- CHEN, S., GENG, P., XIAO, Y., HU, M. (2012): Bioremediation of β -cypermethrin and 3-phenoxybenzaldehyde contaminated soils using *Streptomyces aureus* HP-S-01. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 505-515. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3640-5>
- CHOU, T.-C. & MARTIN, T. (2005): CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ Values. ComboSyn, Inc., Paramus, NJ.
- CHOU, T.-C. & TALALAY, P. (1984): Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships: the Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. https://www.researchgate.net/profile/Ting_Chao_Chou/publication/16813250_Quantitative_Analysis_of_Dose-Effect_Relationships_The_Combined_Effects_of_Multiple_Drugs_or_Enzyme_Inhibitors/links/56bcdf3008aed69599457c45/Quantitative-Analysis-of-Dose-Effect-Relationships-The-Combined-Effects-of-Multiple-Drugs-or-Enzyme-Inhibitors.pdf
- CHOU, T.-C. (2006): Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, 58:3, 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

- CHRÉTIEN, F., GIROUX, I., THÉRIAULT, G., PATRICK, G., CORRIVEAU, J. (2017): Surface runoff and subsurface tile drain losses of neonicotinoids and companion herbicides at edge-of-field. *Environmental Pollution*, 224, 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.002>.
- CLAIR, É., MESNAGE, R., TRAVERT, C., SÉRALINI, G., É. (2012): A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology In Vitro*, 26:269–279. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.009>
- COSSIO, M., L., T., GIESEN, L., F., ARAYA, G., PÉREZ-COTAPOS, M., L., S., VERGARA, R., L., MANCA, M., TOHME, R., A., HOLMBERG, S., D., BRESSMANN, T., LIRIO, D., R., ROMÁN, J., S., SOLÍS, R., G., THAKUR, S., RAO, S., N., MODELADO, E., L., LA, A., D., E., DURANTE, C., TRADICIÓN, U., N., A., EN, M., ESPEJO, E., L., FUENTES, D., E., L., A., S., YUCATÁN, U., A., D., LENIN, C., M., CIAN, L., F., DOUGLAS, M., J., PLATA, L., HÉRITIER, F. (2012): Brock Biology of Microorganism. *Instrumentos Familiares*.
- CROUZET, O., BATHISSON, I., BESSE-HOGGAN, P., BONNEMOY, F., BARDOT, C., POLY, F., BOHATIER, J., MALLETT, C. (2010): Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology & Biochemistry*, 42:2, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.016>
- CROUZET, O., POLY, F., BONNEMOY, F., BRU, D., BATHISSON, I., BOHATIER, J., PHILIPPOT, L., MALLETT, C. (2015): Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environmental Science & Pollution Research*, 23:5, 4207-4217. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4797-8>
- CROUZET, O., WISZNIOWSKI, J., DONNADIEU, F., BONNEMOY, F., BOHATIER, J., MALLETT, C. (2013): Dose-Dependent Effects of the Herbicide Mesotrione on Soil Cyanobacterial Communities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64:23-31. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9809-9>
- CRUZ, A., CAETANO, T., SUZUKI, S., MENDO, S. (2007): *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal. *Marine Environmental Research*, 64:5, 639-650. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.06.006>
- CUHRA, M., TRAAVIK, T., BØHN, T. (2013): Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22:251–262. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1021-1>
- CYCOŃ, M., ZMIJOWSKA, A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. (2014): Enhancement of deltamethrin degradation by soil bioaugmentation with two different strains of *Serratia marcescens*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11, 1305– 1316. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0322-0>
- DARVAS, B. & SZÉKÁCS, A. (2006): Mezőgazdasági Ökotoxikológia. *L'Harmattan Kiadó*, Budapest. ISBN: 9789637343391.
- DARVAS, B. ÉS SZÉKÁCS, A. (2018): A glyphosate – Második rész – Toxikológiai és ökotoxikológia. *Magyar Kémikusok Lapja*, LXXIII. évfolyam 7-8. szám. <https://doi.org/10.24364/MKL.2018.07-08>
- DARVAS, B., FEJES, Á., MÖRTL M., BOKÁN, K., BÁNÁTI, H., FEKETE, G., ÉS SZÉKÁCS, A. (2011): A glyphosate alkalmazásának környezet-egészségügyi problémái. *Növényvédelem*, 47:(9) 387-401.

- DASH, H., R., MANGWANI, N., CHAKRABORTY, J., KUMARI, S., DAS, S. (2013): Marine bacterial: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 561-571. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0>
- DE CARVALHO, C., C., C., R., COSTA, S., S., FERNANDES, P., COUTO, I. AND VIVEIROS, M. (2014): Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus*. *Frontiers in Physiology*, 133:5, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00133>
- DEFARGE, N., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J., SÉRALINI, G., E. (2018): Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, 5:156:163. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijerph13030264>
- DELLAI, A., DRIDI, D., SAKOUHI, S., ROBERT, J., DJELAL, H., MOSRATI, R., CHERIF, A. AND MANSOUR, H., B. (2016): Cytotoxic effect of chlorpyrifos ethyl and its degradation derivatives by *Pseudomonas peli* strain isolated from the Oued Hamdoun River (Tunisia). *Toxicology and Industrial Health*, 32:4, 707-713. <https://doi.org/10.1177/0748233713506957>
- DENG, S., CHEN, Y., WANG, D., SHI, T., WU, X., MA, X., LI, X., HUA, R., TANG, X., LI, Q. (2015): Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.052>
- DI GUARDO, A., VOLPI, E., FINIZIO, A. (2020): Analysis of large-scale monitoring data to identify spatial and temporal trend of risk for terbuthylazine and desethyl-terbuthylazine in surface water bodies of Po plain (Italy). *Science of The Total Environment*, 740, 140121. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140121>
- DICK, R., E. & QUINN, J., P. (1995a): Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 545-550. <https://doi.org/10.1007/BF00218464>
- DICK, R., E., & QUINN, J., P. (1995b): Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiology Letters*, 134, 177-182. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00400-9](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00400-9)
- DOBŠÍKOVÁ, R., BLAHOVÁ, J., MODRÁ, H., ŠKORIČ, M., SVOBODOVÁ, Z. (2011): The effect of acute exposure to herbicide Gardoprim Plus Gold 500 SC on haematological and biochemical indicators and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 80, 359-363. <https://doi.org/10.2754/avb201180040359>
- DUKE, O., S. (1990): Overview of Herbicide Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspectives* (87) 263-271. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087263>.
- DUNLAP, P., V. (1999): Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1:1, 5-12.
- DURAND, S., AMATO, P., SANCELME, M., DELORT, A.-M., COMBOURIEU, B., & BESSE-HOGGAN, P. (2006a): First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 222-228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01923.x>

- DURAND, S., LEGERET, B., MARTIN, A.-S., SANCELME, M., DELORT, A.-M., BESSE-HOGGAN, P., COMBOURIEU, B. (2006b): Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a *Bacillus* strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20:(17) 2603-2613. <https://doi.org/10.1002/rcm.2627>
- DURAND, S., SANCELME, M., BESSE-HOGGAN, P., COMBOURIEU, B. (2010): Biodegradation pathway of mesotrione: complementarities of NMR, LC-NMR and LC-MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere*, 81:3, 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.017>
- DYSON, J., S., BEULKE, S., BROWN, C., D., LANE M., C., G. (2002): Adsorption and Degradation of the Weak Acid Mesotrione in Soil and Environmental Fate Implications. Organic Compound in the Environment. *Journal of Environmental Quality*, 31, 613-618. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.6130>
- DZIGA, D., KOKOCINSKI, M., MAKSYLEWICZ, A., CZAJA-PROKOP, U., BARYLSKI, J. (2016): Cylindrospermopsin biodegradation abilities of *Aeromonas* sp. isolated from Rusałka Lake. *Toxins*, 8(3), 55. <https://doi.org/10.3390/toxins8030055>
- ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (2015): Committee for Risk Assessment RAC Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of Terbutylazine (ISO); N-tert-butyl-6-chloro-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine. <https://echa.europa.eu/documents/10162/7ae57f3d-2f2b-469d-ab34-5b97e48f493a>.
- EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2011): Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbutylazine. *European Food Safety Authority Journal*, 9:1, 1969. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1969>
- EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2015): Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *European Food Safety Authority Journal*, 13:4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>
- EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2016): Outcome of the consultation with Member States, the applicant and EFSA on the pesticide risk assessment for terbutylazine in light of confirmatory data. EFSA Supporting Publications, 14, 1165E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1165>.
- EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2016): Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mesotrione. Conclusions on Pesticides Peer Review. <https://doi:10.2903/j.efsa.2016.4419>
- EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2017a): Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine disrupting properties of glyphosate. *European Food Safety Authority Journal*, 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4979>
- EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2017b): Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance terbutylazine in light of confirmatory data submitted. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.4868/epdf>.
- ELDRIDGE, M., L., SANSEVERINO, J., LAYTON, A., C., EASTER, J., P., SCHULTZ, T., W., SAYLER, G., S. (2007): *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a New Bioluminescent Bioreporter for Detection of Androgenic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6012-6018. <https://doi.org/10.1128/AEM.00589-07>.

- ELLIOTT, S., M. & VANDERMEULEN, D., D. (2017): A regional assessment of chemicals of concern in surface waters of four Midwestern United States national parks. *Science of The Total Environment*, 579, 1726-1735. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.114>
- ELSAIED, O., F., MAILLARD, E., VUILLEUMER, S., MILLET, M., IMFELD, G. (2015): Degradation of chloroacetanilide herbicides and bacterial community composition in lab-scale wetlands. *Science of the Total Environment*. 520, 222-231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.061>
- EMTIYAZJOO, M., SHAFEIAN, E., FARKHANI, D., MAZHAR, F. (2014): Surveying the potential biodegradation of asphaltane and tarball in Khark oil zone by *Brevibacterium iodinum* bacterium. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 4:2, 402-411.
- ERMAKOVA, I., T., KISELEVA, N., I., SHUSHKOVA, T., ZHARIKOV, M., ZHARIKOV, G., A., LEONTIEVSKY A., A. (2010): Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88:585-594. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2775-0>
- EUROPEAN COMMISSION (2003): European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Review report for the active substance mesotrione. SANCO/1416/2001 -Final, 14 April 2003.
- EUROPEAN COMMISSION (2011): Review report for the active substance terbuthylazine finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 17 June 2011 in view of the approval of terbuthylazine as active substances in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=467>.
- EUROPEAN COMMISSION (2017): Commission Implementing Regulation (EU) of Renewing the Approval of the Active Substance Glyphosate 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 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 (D053565-01 – 2017/2904(RSP)) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017IP0395&from=EN>
- EUROPEAN COMMISSION (2021): Third Annual Forum on Endocrine Disruptors. Exchanging knowledge, identifying challenges, building synergies. Conferences and Summits. https://ec.europa.eu/environment/events/third-annual-forum-endocrine-disruptors_en
- FAHY, A., MCGENITY, T., J., TIMMIS, K., N., BALL, A., S. (2006): Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 58:260–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00162.x>
- FAUST, M., ALTENBURGER, R., BOEDEKER, W., GRIMME, L., H. (1994): Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 134–141. <https://doi.org/10.1007/BF00205150>.
- FERENCZI, SZ., CSERHÁTI, M., KRIFATON, CS., SZOBOSZLAY, S., KUKOLYA, J., SZÓKE, ZS., KŐSZEI, B., ALBERT, M., BARNA, T., MÉZES, M., KOVÁCS, K., J., KRISZT, B. (2014): A new Ochratoxin A Biodegradation Strategy Using *Cupriavidus basilensis* ÓR16 Strain. *PLoS ONE* 9(10): e109817, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109817>
- FERNÁNDEZ-ALBA, A., R., PIEDRA, L., MEZCUA, M., HERNANDO, M., D. (2002): Toxicity of Single and Mixed Contaminants in Seawater Measured with Acute Toxicity Bioassays. Short Communication - Analysis, Toxicity and Biodegradation of Organic Pollutants in Groundwater from Contaminated Land,

- Landfills and Sediments, *The Scientific World Journal*, 2, 1115–1120. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.221>.
- FILIMONOVA, V., GONÇALVES, F., MARQUES, J., C., DE TROCH, M., GONÇALVES, A., M., M. (2016): Biochemical and toxicological effects of organic (herbicide Primextra® Gold TZ) and inorganic (copper) compounds on zooplankton and phytoplankton species. *Aquatic Toxicology*, 177, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.008>
- FORLANI, G., MANGIACALLI, A., NIELSEN, E., SUARDI, C., M. (1999): Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:7, 991–997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00010-3)
- FRANCISCON, E., GROSSMAN, M., J., PASCHOAL, J., A., R., REYES, F., G., R., DURRANT, L., R. (2012): Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium* sp. strain VN-15. *SpringerPlus*, 1, 37. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-37>
- FROEHNER, K., BACKHAUS, T., GRIMME, L., H. (2000): Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. *Chemosphere*, 40:8, 821-828. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00274-X)
- FROEHNER, K., MEYER, W., GRIMME, L., H. (2002): Time-dependent toxicity in the long-term inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 46:7, 987-997. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00209-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00209-0)
- FUENTES, S., MÉNDEZ, V., AGUILA, P., SEEGER, M. (2014): Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>
- GAMAIN, P., GONZALEZ, P., CACHOT, J., PARDON, P., TAPIE, N., GOURVES, P., Y., BUDZINSKI, H., MORIN, B. (2016): Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 113, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.11.002>
- GAO, D., MAEHARA, A., YAMANE, T., UEDA, S. (2001): Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiology Letters*, 196:2, 159-164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10558.x>
- GASNIER, C., DUMONT, C., BENACHOUR, N., CLAIR, E., CHAGNON, M., C., SÉRALINI, G., E. (2009): Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262:184–191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>
- GETENGA, Z., DÖRFLER, U., IWOB, A., SCHMID, M., SCHROLL, R. (2009): Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere*, 77:4, 534-539. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.031>
- GIL, M., HAIDOUR, A., RAMOS, J.L. (2000): Degradation of o-methoxybenzoate by a two-member consortium made up of a gram-positive *Arthrobacter* strain and a gram-negative *Pantotea* strain. *Biodegradation*, 11:1, 49-53. <https://doi.org/10.1023/A:1026541518663>

- GILBERT, E., S. & CROWLEY, D., E. (1997): Plant Compounds That Induce Polychlorinated Biphenyl Biodegradation by *Arthrobacter* sp. Strain BIB. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1933-1938. <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.1933-1938.1997>
- GIROTTI, S., FERRI, E., N., FUMO, M., G., MAIOLINI, E. (2008): Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 608:1, 2-29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.12.008>
- GÖTZ, T. & BÖGER, P. (2004): The Very-Long-Chain Fatty Acid Synthase Is Inhibited by Chloroacetamides. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59:7-8, 549-553. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-818>
- GRENNI, P. (2011): Effects of pesticides and pharmaceuticals on soil and water bacterial communities. *PhD thesis in Environmental Science, University of Milano-Bicocca*.
- GRENNI, P., GIBELLO, A., CARACCILO, A., B., FAJARDO, C., NANDE, M., VARGAS, R., SACCA, M., L., MARTINEZ-INIGO M., J., CICCOLI, R., MARTÍN, M. (2009): A new fluorescent oligonucleotide probe for *in situ* detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. *Water Research*, 43:12, 2999-3008. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.022>
- GRENNI, P., RODRÍGUEZ-CRUZ, M., S., HERRERO-HERNÁNDEZ, E., MARÍN-BENITO, J., M., SÁNCHEZ-MARTÍN, M., J., CARACCILO, A., B. (2012): Effects of wood amendments on the degradation of terbuthylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 5401–5412. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1289-z>.
- GRUIZ, K., HORVÁTH, B. ÉS MOLNÁR, M. (2001): Környezettoxikológia - Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára. *Műegyetem Kiadó*, Budapest.
- GUMUSCU, B. & TEKINAY, T. (2013): Effective biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene using a novel bacterial strain isolated from TNT-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.007>
- GUO, C., L., ZHOU, H., W., WONG, Y., S., TAM, N., F., Y. (2005): Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Marine Pollution Bulletin*, 51:8-12, 1054-1061. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.012>
- GUPTA, K., P. (2017): Herbicides and fungicides. *Biomarkers in Toxicology* (pp. 409–431). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00024-5>
- GUZZELLA, L., POZZONI, F., GIULIANO, G. (2006): Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environmental Pollution*, 142:2, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.037>.
- GÜRTLER, V., MAYALL, B., C., SEVIOUR, R. (2004): Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 377-403. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.001>
- HÁHN, J. (2017): Az *atrazine* és *terbuthylazine* hatóanyagok biodetoxifikációjának vizsgálata komplex biológiai hatásmérő módszerekkel, Doktori (Ph.D.) értekezés. Szent István Egyetem, Gödöllő. <https://doi.org/10.14751/SZIE.2017.092>.

- HÁHN, J., SZOBOSZLAY, S., TÓTH, G., KRISZT, B. (2017): Assessment of bacterial biodegradation of herbicide atrazine using *Aliivibrio fischeri* cytotoxicity assay with prolonged contact time. *Ecotoxicology*, 26:648-657. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1797-0>
- HALÁSZ, A., GELENCSÉR, É., ADÁNYINÉ KISBOCSKÓI, N., BATÁNE VIDÁCS, I., CSERHALMI, ZS., TÖMÖSKÖZINÉ FARKAS, R., HEGÓCZKI, J., KUKOLYA, J. & SZÉKÁCS, A. (2013): Élelmiszer-tudományi és környezetbiztonsági kutatások a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetben (KÉKI). *Biokémia - a Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata*. XXXVII. évfolyam, 2. szám, 44-45.
- HALL, M.G., WILKS, M.F., MCLEAN PROVAN, W., EKSBORG, S., LUMHOLTZ, B. (2001): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52:2, 169-177. <https://doi.org/10.1046/j.0306-5251.2001.01421.x>
- HARKAI, P., SZABÓ, I., CSERHÁTI, M., KRIFATON, CS., RISA, A., RADÓ, J., BALÁZS, A., BERTA, K., KRISZT, B. (2016): Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 48-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.007>
- HARTNETT, S., MUSAH, S., DHANWADA, K., R. (2013): Cellular effects of metolachlor exposure on human liver (HepG2) cells. *Chemosphere*, 90:3, 1258–1266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.077>
- HAYES, V., E., A., TERNAN, N., G. & MCMULLAN, G. (2000): Organophosphate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS Microbiology Letters*, 186:2, 171–175. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09099.x>
- HERNANDO, M., D., EJERHOON, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A., R., CHISTI, Y. (2003): Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water Research*, 37:17, 4091–4098. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00348-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00348-8).
- HILDEBRANDT, A., GUILLAMÓN, M., LACORTE, S., TAULER, R., BARCELÓ, D. (2008): Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research*, 42:13, 3315–3326. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.009>
- HIRMANN, D., LOIBNER, A., P., BRAUN, R., SZOLAR, O., H., J. (2007): Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 67:6, 1236–1242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.047>.
- HLADIK, M., L., BOUWER, E., J., ROBERTS, A., L. (2008): Neutral chloroacetamide herbicide degradates and related compounds in Midwestern United States drinking water sources. *Science of The Total Environment*, 390:1, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.042>
- HLADIK, M., L., HSIAO, J., J., & ROBERTS, A., L. (2005): Are Neutral Chloroacetamide Herbicide Degradates of Potential Environmental Concern? Analysis and Occurrence in the Upper Chesapeake Bay. *Environmental Science & Technology*, 39:17, 6561-6574. <https://doi.org/10.1021/es050268w>

- HORTH, H. & BLACKMORE, K. (2009): Survey of Glyphosate and AMPA in Groundwaters and Surface Waters in Europe. Report by WRc plc, Swindon, Swindon, Wiltshire, United Kingdom. No.: UC8073.02, november 2009.
- HOWE, C., M., BERRILL, M., PAULI, B., D., HELBING, C., C., WERRY, K., VELDHOEN, N. (2004): Toxicity Of Glyphosate-Based Pesticides To Four North American Frog Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:1928–1938. <https://doi.org/10.1897/03-71>
- HSUEH, C.-C., YOU, L.-P., LI, J.-Y., CHEN, C.-T., WU, C.-C., CHEN, B.-Y. (2016): Feasibility study of reduction of nitroaromatic compounds using indigenous azo dye-decolorizers. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 64, 180-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2016.04.015>
- HUANG, J., SUN, B. AND XIABO, Z. (2010): *Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1585-1589. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013300-0>
- HUND, H.-K., DE BEYER, A. AND LINGENS, F. (1990): Microbial Metabolism of Quinoline and Related Compounds. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 371, 1005-1008.
- IARC (2017): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans-volume 112: some organophosphate insecticides and herbicides. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf>
- IWAKI, H., SHIMIZU, M., TOKUYAMA, T., HASEGAWA, Y. (1999): Biodegradation of Cyclohexylamine by *Brevibacterium oxydans* IH-35A. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2232-2234. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2232-2234.1999>
- IYER, R. & IKEN, B. (2013): Identification of water-borne bacterial isolates for potential remediation of organophosphate contamination. *Advances in Biological Chemistry*, 3:1. <https://doi.org/10.4236/abc.2013.31018>
- JABLONOWSKI, N., D., SCHÄFFER, A., BURAUUEL, P. (2011): Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 328-331. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0431-y>
- JACOB, G., S., GARBOW, J., R., HALLLAS, L., E., KIMACK, N., M., KISHORE, G., M., SCHAEFER, J. (1988): Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain Lbr. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 2953–2958. <https://doi.org/10.1128/AEM.54.12.2953-2958.1988>
- JAMES, T., K., RAHMAN, A. & HICKING, J. (2006): Mesotrione – A new herbicide for weed control in maize. *New Zealand Plant Protection*, 59: 242-249.
- JARIYAL, M., GUPTA, V., K., MANDAL, K., JINDAL, V. (2015): *Brevibacterium frigoritolerans* as a Novel Organism for the Bioremediation of Phorate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95, 680-686. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1617-2>
- JARIYAL, M., GUPTA, V., K., MANDAL, K., JINDAL, V., BANTA, G., SINGH, B. (2014): Isolation and characterization of novel phorate-degrading bacterial species from agricultural soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:3, 2214-2222. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2155-2>
- JAWORSKA, J., VAN GENDEREN-TAKKEN, H., HANSTVEIT, A., VAN DE PLASSCHE, E., FEIJTEL, T. (2002): Environmental risk assessment of phosphonates, used in domestic laundry and cleaning agents in the Netherlands. *Chemosphere*, 47:6, 655-665. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00328-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00328-9)

- JIANG, Z., ZHANG, X., WANG, Z., CAO, B., DENG, S., BI, M., ZHANG, Y. (2019): Enhanced biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. DNS10 during co-culture with a phosphorus solubilizing bacteria: *Enterobacter* sp. P1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.070>
- JIN, Y., WANG, L., CHEN, G., LIN, X., MIAO, W., FU, Z. (2014): Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37:2, 782-790. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.014>
- JOLY, P., BESSE-HOGGAN, P., BONNEMOY, F., BATISSON, I., BOHATIER, J., MALLET C. (2012): Impact of Maize Formulated Herbicides Mesotrione and S-Metolachlor, Applied Alone and in Mixture, on Soil Microbial Communities. *International Scholarly Research Network Ecology*, Volume 2012, Article ID 329898, 9 pages. <https://doi.org/10.5402/2012/329898>
- JOLY, P., BONNEMOY, F., CHARVY, J., C., BOHATIER, J., MALLET, C. (2013): Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere*, 93, 2444–2450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.074>
- JÓZSEF, CS. & RADVÁNY, B. (2013): *Mesotrione* - az új hatóanyag - avagy mérőföldkő a kukorica gyomirtásában. *Agronapló* pp. 24.
- JURINA, T., TERZIĆ, S., AHEL, M., STIPIČEVIĆ, S., KONTREC, D., KURTANJEK, Ž., UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. (2014): Catabolism of terbuthylazine by mixed bacterial culture originating from s-triazine-contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 7223-7232. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5774-8>
- KALE, V., M., MIRANDA, S., R., WILBANKS, M., S., MEYER, S., A. (2008): Comparative cytotoxicity of alachlor, acetochlor, and metolachlor herbicides in isolated rat and cryopreserved human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22:1, 41–49. <https://doi.org/10.1002/jbt.20213>
- KASANA, R., C. & PANDEY, C., B. (2018): *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38:1, 141-156. <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2017.1312273>
- KAZUFUMI, O., KAKUTA, T., SAKAI, T., HIROTA, H., HOSHINO, T., UCHIYAMA, T. (1996): Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82:3, 299-305. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)88823-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)88823-4)
- KEBRIA, D., Y., KHODADADI, A., GANJIDOUST, H., BADKOUBI, A., AMOOZEGAR, M., A. (2009): Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6:3, 435-442. ISSN: 1735-1472.
- KHEHRA, M., S., SAINI, H., S., SHARMA, D., K., CHADHA, B., S., CHIMNI, S., S. (2005): Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, 67:1, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2004.10.008>
- KJELDSSEN, L., S., GHISARI, M., BONEFELD-JØRGENSEN, E., C. (2013): Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272:2, 453-464. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.06.028>
- KOTOUČKOVÁ, L., SCHUMANN, P., DURNOVÁ, E., SPRÖER, C., SEDLÁČEK, I., NEČA, J., ZDRÁHAL, Z., NĚMEC, M. (2004): *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-

- degrading actinobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:3, 773-777. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02923-0>
- KOUTNY, M. & ZAORALKOVA, L. (2005): Miniaturized kinetic growth inhibition assay with denitrifying bacteria *Paracoccus denitrificans*. 60:1, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.007>
- KOWALCYZK, A., EYICE, Ö., SCHÄFER, H., PRICE, O., R., FINNEGAN, C., J., VAN EGMOND, R., A., SHAW, L., J., BARRETT, G., BENDING, G., D. (2015): Characterization of *para*-Nitrophenol-Degrading Bacterial Communities in River Water by Using Functional Markers and Stable Isotope Probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81:19, 6890-6900. <https://doi.org/10.1128/AEM.01794-15>
- KÖCK, M., FARRÉ, M., MARTÍNEZ, E., GAJDA-SCHRANTZ, K., GINEBREDA, A., NAVARRO, A., DE ALDA, M., L., BARCELÓ, D. (2010): Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology*, 383:1-2, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.12.029>.
- KRAMER, K., J., M. (2009): Continuous Monitoring of Waters by Biological Early Warning Systems. Water Quality Measurements Series, Rapid Chemical and Biological Techniques for Water Monitoring. *John Wiley and Sons, Ltd.*, ISBN 978-0-470-05811-4.
- KSH - KÖZPONTI STATISZTIKAI HIVATAL (2017): Forgalomba hozott növényvédőszer-hatóanyagok mennyisége (2011-). http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omf005.html
- LAITINEN, P., RAMO, S., SIIMES, K. (2007): Glyphosate translocation from plants to soil-does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant Soil*, 300:51–60. DOI 10.1007/s11104-007-9387-1
- LAJMANOVICH, C., R., SANDOVAL, T., M. & PELTZER, M., P. (2003): Induction of Mortality and Malformation in *Scinax nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(3):612–618. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0029-x>
- LAKSHMIKANDAN, M., SIVARAMAN, K., RAJA, S., VASANTHAKUMAR P., RAJESH, R., P., SOWPARTHANI, K., JEBASINGH, S., E., J. (2014): Biodegradation of acrylamide by acrylamidase from *Stenotrophomonas acidaminiphila* MSU12 and analysis of degradation products by MALDI-TOF and HPLC. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.014>
- LAROSSA, R., A., & FALCO, S., C. (1984): Amino acid biosynthetic enzymes as targets of herbicide action. *Trends in Biotechnology*. 2: 158–161. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(84\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(84)90033-7)
- LAVILLE, N., BALAGUER, P., BRION, F., HINFRAY, N., CASELLAS, C., PORCHER, J.-M., AÏT-AÏSSA, S. (2006): Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228:1, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.021>
- LEBLANC, H., M., K., CULP, J., M., BAIRD, D., J., ALEXANDER, A., C., CESSNA, A., J. (2012): Single Versus Combined Lethal Effects of Three Agricultural Insecticides on Larvae of the Freshwater Insect *Chironomus dilutus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 378–390. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9777-0>.

- LEFRANCQ, M. (2014): Transport and attenuation of pesticides in runoff from agricultural headwater catchments: from field characterisation to modelling. Earth Sciences. Université de Strasbourg, 2014. English. NNT: 2014STRAH004ff. tel-01037928 <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01037928>
- LEFRANCQ, M., JADAS-HÉCART, A., LA JEUNESSE, I., LANDRY, D., PAYRAUDEAU, S. (2017): High frequency monitoring of pesticides in runoff water to improve understanding of their transport and environmental impacts. *Science of the Total Environment*, 587–587, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.022>.
- LEMAIRE, G., MNIF, W., PASCUSI, J.-M., PILLON, A., RABENOELINA, F., FENET, H., GOMEZ, E., CASELLAS, C., NICOLAS, J.-C., CAVAILLÈS, V., DUCHESNE, M.-J., BALAGUER, P. (2006): Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System. *Toxicological Sciences*, 91:2, 501-509. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj173>
- LI, C.-M., WU, H.-Z., WANG, Y.-X., ZHU, S., WEI, C.-H. (2020): Enhancement of phenol biodegradation: Metabolic division of labor in co-culture of *Stenotrophomonas* sp. N5 and *Advenella* sp. B9. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 5, 123214. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123214>
- LIE, M., M., F., CHEN, Y., WANG, Z., LI, Z. (2009): Enantioselective benzylic hydroxylation of indan and tetralin with *Pseudomonas monteilii* TA-5. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20:10, 1206–1211. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.04.006>
- LIU Y., WANG, L., HUANG, K., WANG, W., NIE, X., JIANG, Y., LI, P., LIU, S., XU, P. & TANG, H. (2014c): Physiological and Biochemical Characterization of a Novel Nicotine-Degrading Bacterium *Pseudomonas geniculata* N1. *PLOS One*, 9:1, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084399>
- LIU, C.-M., MCLEAN, P., A., SOOKDEO, C., C., CANNON, F., C. (1991): Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1799–1804. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.6.1799-1804.1991>
- LIU, H. & XIONG, M. (2009): Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology*, 93:2-3, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.006>
- LIU, J., CHEN, S., DING, J., XIAO, Y., HAN, H., ZHONG, G. (2015): Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Environmental Biotechnology*, 99, 10839-10851. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6935-0>
- LIU, J., HE, Y., CHEN S., XIAO, Y., HU, M., ZHONG, G. (2014a): Development of a Freeze-Dried Fungal Wettable Powder Able to Biodegrade Chlorpyrifos on Vegetables. *PLOS One*, 9:7, e103558, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103558>
- LIU, J., PAN, D., WU, X., CHEN, H., CAO, H., LI, Q., X., HUA, R. (2018): Enhanced degradation of prometryn and other s-triazine herbicides in pure cultures and wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate immobilized *Leucobacter* sp. JW-1. *Science of The Total Environment*, 615, 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.208>
- LIU, S., YING, G.-G., LIU, Y.-S., PENG, F.-Q., HE, L.-Y. (2013): Degradation of Norgestrel by Bacteria from Activated Sludge: Comparison to Progesterone. *Environmental Science & Technology*, 47:18, 10266-10276. <https://doi.org/10.1021/es304688g>
- LIU, S.-Y., LU, M.-H., BOLLAG, J.-M. (1990): Transformation of metolachlor in soil inoculated with *Streptomyces* sp. *Biodegradation*, 1, 9-17. <https://doi.org/10.1007/BF00117047>

- LIU, Y., CHEN, X., BLOM, J., YI, Z., WEN, J., ZENGA, R. (2014b): Draft genome of formaldehyde-degrading strain, *Pseudomonas monteilii* IOFA19. *Marine Genomics*, 15, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.04.005>
- LIU, Z., YANG, C., QIAO, C. (2007): Biodegradation of p-nitrophenol and 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 277:2, 150-156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00940.x>
- LOOS, R., LOCORO, G., COMERO, S., CONTINI, S., SCHWESIG, D., WERRES, F., BALSAA, P., GANS, O., WEISS, S., BLAHA, L., BOLCHI, M., GAWLIK, B., M. (2010): Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*, 44:14, 4115-4126. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032>
- LOPEZ, B., OLLIVIER, P., TOGOLA, A., BARAN, N., GHESTEM, J.-P. (2015): Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants. *Science of The Total Environment*, 518–519, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.110>
- LOWRY, D., M., GREINER, D., FRETHEIM, M., UBBEN, M., DHANWADA, K., R. (2013): Mechanism of metolachlor action due to alterations in cell cycle progression. *Cell Biology and Toxicology*, 29:283-291. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9256-z>
- LOZANO, V., L., DEFARGE, N., ROCQUE, L.-M., MESNAGE, R., HENNEQUIN, D., CASSIER, R., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J., PANOFF, J.-M., SÉRALINI, G.-E., AMIEL, C. (2018): Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. *Toxicology Reports*, 5, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.005>
- LU, P., LI, Q., LIU, H., FENG, Z., YAN, X., HONG, Q., LI, S. (2013): Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresource Technology*, 127, 337-342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.116>
- LUTRI, V., F., MATTEODA, E., BLARASIN, M., APARICIO, V., GIACOBONE, D., MALDONADO, L., BECHER QUINODOZ, F., CABRERA, A., GIULIANO ALBO, J. (2020): Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina. *Science of the Total Environment*, 711, 134557. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134557>
- MACLOUGHLIN, M., T., PELUSO, L., M., APARICIO, C., V., MARINO, J., G., D. (2020): Contribution of soluble and particulate-matter fractions to the total glyphosate and AMPA load in water bodies associated with horticulture. *Science of the Total Environment*, 703, 134717. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134717>
- MADIGAN, M., T., MARTINKO, J., M., STAHL, D., CLARK, D., P. (2010): Brock Biology of Microorganisms (13th Edition). Benjamin Cummings, San Francisco, 496-497.
- MAI, H., GONZALEZ, P., PARDON, P., TAPIE, N., BUDZINSKI, H., CACHOT, J., MORIN, B. (2014): Comparative responses of sperm and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metalochlor and its degradation products. *Aquatic Toxicology*, 147, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024>
- MAITI, A., DAS, S., BHATTACHARYYA, N. (2012): Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus thuringiensis* Strain NA2. *Journal of Science (JOS)*, 1:4, 72-75.

- MAQUEDA, C., UNDABEYTI, T., VILLAVERDE, J., MORILLO, E. (2017): Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 593-594, 787-795. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.202>
- MARONIĆ, D., S., ČAMAGAJEVAC, I., S., HORVATIĆ, J., PFEIFFER, T., Z., STEVIĆ, F., ŽARKOVIĆ, N., WAEG, G., JAGANJAC, M. (2018): S-metolachlor promotes oxidative stress in green microalga *Parachlorella kessleri* – A potential environmental and health risk for higher organisms. *Science of The Total Environment*, 637-638, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.433>
- MARQUES, A., GUILHERME, S., GAIVÃO, I., SANTOS, M., A., PACHECO, M. (2014): Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods - Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology*, 166:126–133. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.07.009>
- MARTÍNEZ, M.-A., ARES, I., RODRÍGUEZ, J.-L., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.-R., ANADÓN, A. (2018): Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environmental Research*, 161, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.051>
- MARTÍNEZ, M.-A., RODRÍGUEZ, J.-L., LOPEZ-TORRES, B., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.-R., MAXIMILIANO, J.-E., ANADÓN, A., ARES, I. (2020): Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environment International*, 135, 105414. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105414>
- MARTÍNKOVÁ, L., UHNÁKOVÁ, B., PÁTEK, M., NEŠVERA, J., KŘEN, V. (2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35, 162-177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
- MARTINS, P., F., MARTINEZ, C., O., CARVALHO, G., D., CARNEIRO, P., I., B., AZEVEDO, R., A., PILEGGI, S., A., V., MELO, I., S., D. & PILEGGI, M. (2007): Selection of Microorganisms Degrading S-Metolachlor Herbicide. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50:1, 153-159. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000100019>
- MARTIN-SANCHEZ, P., M., GORBUSHINA, A., A., TOEPEL, J. (2018): Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture- and qPCR-based approaches. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.009>
- MARTIN-YKEN, H. (2020): Yeast-Based Biosensors: Current Applications and New Developments. *Biosensors*, 10:51, 1-19. <https://doi.org/10.3390/bios10050051>
- MASUDA, M., YAMASAKI, Y., UENO, S., INOUE, A. (2007): Isolation of bisphenol A-tolerant/degrading *Pseudomonas monteilii* strain N-502. *Extremophiles*, 11:2, 355-362. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0047-9>
- MATHIAS, F., T., ROMANO R., M., SLEIMAN, H., K., DE OLIVEIRA, C., A., ROMANO, M., A. (2012): Herbicide Metolachlor Causes Changes in Reproductive Endocrinology of Male Wistar Rats. *International Scholarly Research Notices*, 2012, 7. <https://doi.org/10.5402/2012/130846>
- MATSUOKA, M., PARK S., AN, S.-Y., MIYAHARA, M., KIM, S.-W., KAMINO, K., FUSHINOBU, S., YOKOTA, A., WAKAGI, T. & SHOUN, H. (2012): *Advenella faeciporci* sp. nov., a nitrite-denitrifying bacterium isolated from nitrifying–denitrifying activated sludge collected from a laboratory-scale

- bioreactor treating piggery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 12: 2986–2990. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.037440-0>
- MATTSON, M., P. (2008): Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7:1, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- MEGHARAJ, M., RAMAKRISHNAN, B., VENKATESWARLU, K., SETHUNATHAN, N., NAIDU, R. (2011): Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environmental International*, 37:8, 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- MEKUTO, L., ALEGBELEYE, O., O., NTWAMPE, S., K., O., NGONGANG, M., M., MUDUMBI, J., B., AKINPELU, E., A. (2016): Co-metabolism of thiocyanate and free cyanide by *Exiguobacterium acetylicum* and *Bacillus marisflavi* under alkaline conditions. *Biotech*, 6:173. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0491-x>
- MERCADANTE, R., POLLEDRI, E., BERTAZZI, P., A., FUSTINONI, S. (2013): Biomonitoring short- and long-term exposure to the herbicide terbuthylazine in agriculture workers and in the general population using urine and hair specimens. *Environment International*, 60, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.016>
- MERTENS, B., BLOTHE, C., WINDEY, K., DE WINDT, W., VERSTRAETE, W. (2007): Biocatalytic dechlorination of lindane by nano-scale particles of Pd(0) deposited on *Shewanella oneidensis*. *Chemosphere*, 66, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.018>
- MESNAGE, R. & ANTONIOU, M., N. (2018): Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. *Frontiers in Public Health*, 5, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>
- MESNAGE, R., & ANTONIOU, M., N. (2020): Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. *Current Research in Toxicology*, 1, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2020.04.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>
- MESNAGE, R., PHEDONOS, A., BISERNI, M., ARNO, M., BALU, S., CORTON, J., C., UGARTE, R., ANTONIOU, M., N. (2017): Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 108:30–42. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.025>
- MIKULIKOVA, I., MODRA, H., BLAHOVA, J., KRUIKOVÁ, K., MARSALEK, P., BEDANOVA, I., SVOBODOVA, Z. (2013): Recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio*) after a short-term exposure to terbuthylazine. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16:1, 17-23. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0003>
- MIN, J., CHEN, W., HU, X. (2019): Biodegradation of 2,6-dibromo-4-nitrophenol by *Cupriavidus* sp. strain CNP-8: Kinetics, pathway, genetic and biochemical characterization. *Journal of Hazardous Materials*, 361, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.063>
- MITCHELL, G., BARTLETT, D., W., FRASER, T., E., M., HAWKES, T., R., HOLT, D., C., TOWNSON, J., K., WICHERT, R., A. (2001): Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science*, 57, 120–128. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E)

- MIYASHIRO, T. & RUBY, E., G. (2013): Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 84:5, 795–806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x>
- MMWD - MARINE MUNICIPAL WATER DISTRICT (2010): Herbicide Risk Assessment. Chapter 7: Pelargonic Acid. <https://www.marinwater.org/DocumentCenter/View/252/Herbicide-Risk-Assessment-Chapter-7-Pelargonic-Acid-January-1-2010?bidId=>.
- MNIF, I., MAKTOUF, S., FENDRI, R., KRIAA, M., ELLOUZE, S., GHRIBI, D. (2015): Improvement of methyl orange dye biotreatment by a novel isolated strain, *Aeromonas veronii* GRI, by SPB1 biosurfactant addition. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:1742-1754. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5294-9>
- MOORE, I., K., BRAYMER, H., D., LARSON, A., D. (1983): Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilises the phosphonate herbicide glyphosate. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 316–320. <https://doi.org/10.1128/AEM.46.2.316-320.1983>
- MORI, T., SAKIMOTO, M., KAGI, T., SAKAI, T. (1996): Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus megaterium* That Degrades Poly(vinyl alcohol). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60:2, 330-332. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.330>
- MORKUS, P., ZOLFAGHARI, M., PARRELLO, D., CSORDAS, M., MALIKOV, M., ROSE, J., CHOI, K., B., FILIPE, C., D., M., LATULIPPE, D., R. (2019): Optimization of microorganism preservation conditions for the development of an acute toxicity bioassay for biocides. *Chemosphere*, 221, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.182>.
- MÖRTL, M., MALOSCHIK, E., JURACSEK, J. & SZÉKÁCS, A. (2010): Növényvédőszer-maradékok gázkromatográfiás és immunanalitikai meghatározásának eredményei vizekben és talajokban. - MONTABIO - füzetek IV. MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Budapest, pp. 29-39. [http://bdarvas.hu/download/pdf/MONTABIO_fuzet_IV_A5\[1\].pdf](http://bdarvas.hu/download/pdf/MONTABIO_fuzet_IV_A5[1].pdf)
- 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. <http://doi:10.1016/j.microc.2012.05.021>.
- MUNOZ, A., KOSKINEN, W., C., COX, L., SADOWSKY, M., J. (2011): Biodegradation and Mineralization of Metolachlor and Alachlor by *Candida xestobii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:2, 619-627. <https://doi.org/10.1021/jf103508w>
- NAIK – AGRÁRGAZDASÁGI KUTATÓINTÉZET (2020): Növényvédő szerek értékesítése, 2019 XIX. évfolyam 1. szám, ISSN 1418 2130, Budapest. http://repo.aki.gov.hu/3555/1/%C3%89VES%20KIADV%C3%81NY_2019_N%C3%B6vszer_.pdf
- NAKAYAMA, K., KATO, A., UENO, Y., MINODA, Y., KOMAGATA, K. (1980): Studies on the metabolism of trichothecene mycotoxins. Metabolism of T-2 toxin with the soil bacteria. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, 12, 30-32.
- NARDI, J., MORAS, P., B., KOEPPE, C., DALLEGRAVE, E., LEAL, M., B., ROSSATO-GRANDO, L., G. (2017): Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glyphosate leads to endocrine disruption. *Food and Chemical Toxicology*, 100:247–252. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.030>
- NAVARRO, S., VELA, N., GIMENEZ, M., J., NAVARRO, G. (2004): Persistence of four s-triazine herbicides in river, sea and groundwater samples exposed to sunlight and darkness under laboratory

- conditions. *Science of The Total Environment*, 329:1-3, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.013>
- NÉBIH – NEMZETI ÉLELMISZERLÁNC BIZTONSÁGI HIVATAL (2016): Két tucat glifozát készítmény engedélyét vonta vissza a NÉBIH. Sajtóközlemény, 2016. december 21. <https://portal.nebih.gov.hu/-/ket-tucac-glifozat-keszitmeny-engedelyet-vonta-vissza-a-nebih>
- NÉBIH – NEMZETI ÉLELMISZERLÁNC BIZTONSÁGI HIVATAL (2020): Kötelező adatszolgáltatás az előző évi növényvédő szerforgalomról. 2020. évi szerforgalmi jelentés. <https://portal.nebih.gov.hu/-/kotelezo-adatszolgaltatas-az-elozo-evi-novenyvedo-szerforgalomrol>
https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/367102/2020_Szerforgalom.pdf/b2ede09b-78e2-80d2-ea4a-8eef001e19d8?t=1641205924789
- NEROZZI, C., RECUERO, S., GALEATI, G., BUCCI, D., SPINACI, M., YESTE, M. (2020): Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Scientific Reports, Nature Research*, 10:11026. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67538-w>
- NEVES, M., CASTRO, B., B., VIDAL, T., VIEIRA, R., MARQUES, J., C., COUTINHO, J., A., P., GONCALVES, F., GONCALVES, A., M., M. (2015): Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological Indicators*, 53, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.031>
- NG, I.-S., CHEN, T., LIN, R., ZHANG, X., NI, C., SUN, D. (2014): Decolorization of textile azo dye and Congo red by an isolated strain of the dissimilatory manganese-reducing bacterium *Shewanella xiamenensis* BC01. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2297-2308. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5151-z>
- NI, Y., LAI, J., WAN, J., & CHEN, L. (2014): Photosynthetic responses and accumulation of mesotrione in two freshwater algae. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16, 2288-2294. <https://doi.org/10.1039/C4EM00254G>
- NISHA, K., N., DEVI, V., VARALAKSHMI, P., ASHOKKUMAR, B. (2015): Biodegradation and utilization of dimethylformamide by biofilm forming *Paracoccus* sp. strains MKU1 and MKU2. *Bioresource Technology*, 188, 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.042>
- NOUROUZI, M., M., CHUAH, T., G., CHOONG, T., S., Y., & LIM, C., J. (2011): Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal of Chemistry*, 8(4), 1582-1587. <https://doi.org/10.1155/2011/614109>
- NOWACK, B. (1997): Determination of phosphonates in natural waters by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 773:1-2, 139-146. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00202-1)
- OBOJSKA A., TERNAN, N., G., LEJCZAK, B., KAFARSKI, P., & MCMULLAN G. (2002): Organophosphonate utilization by the Thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4, 2081-2084. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.2081-2084.2002>
- OBOJSKA, A., LEJCZAK, B., KUBRAK, M. (1999): Degradation of phosphonates by streptomycete isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 872-876. <https://doi.org/10.1007/s002530051476>

- OGUGBUE, C., J., MORAD, N., SAWIDIS, T., ORANUSI, N., A. (2012): Decolorization and partial mineralization of a polyazo dye by *Bacillus firmus* immobilized within tubular polymeric gel. *Biotech*, 2:1, 67-78. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0035-3>
- OH, S., Y., HEO, N., S., SHUKLA, S., KANG, S.-M., LEE, I., LEE, H., BAJPAI, V., K., JANG, S.-C., HAN, Y.-K., ROH, C., HUH, Y., S. (2018): Multi-stress radioactive-tolerant *Exiguobacterium acetylicum* CR1 and its applicability to environmental cesium uptake bioremediation. *Journal of Cleaner Production*, 205, 281-290. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.077>
- OLCHANHESKI, L., R., DOURADO, M., N., BELTRAME, F., L., ZIELINSKI, A., A., F., DEMIATE, I., M., PILEGGI, S., A., V., AZEVEDO, R., A., SADOWSKY, M., J., PILEGGI, M. (2014): Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- α . *PLoS One*, 9, e99960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099960>
- ORCARAY, L., MARINO, D., ROYUELA, M. (2010): The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, 262–269. <https://doi.org/10.1002/ps.1868>
- OSANO, O., ADMIRAAL, W., KLAMER, H., J., C., PASTOR, D., BLEEKER, E., A., J. (2002): Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*, 119:2, 195-202. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00334-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00334-7)
- OTTO, S., PAPPALARDO, S., E., CARDINALI, A., MASIN, R., ZANIN, G., BORIN, M. (2016): Vegetated Ditches for the Mitigation of Pesticides Runoff in the Po Valley. *PLOS One*, 11, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153287>.
- PAGANELLI, A., GNAZZO, V., ACOSTA, H., LO, S., L., CARRASCO, E. (2010): Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23:1586–1595. <https://doi.org/10.1021/tx1001749>
- PANDEY, A. & RUDRAIAH, M. (2015): Analysis of endocrine disruption effect of Roundup® in adrenal gland of male rats. *Toxicology Reports*, 2:1075–1085. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.07.021>
- PANNACCI, E. & ONOFRI, A. (2016): Alternatives to terbuthylazine for chemical weed control in maize. *Communications in Biometry and Crop Science*, 11:1, 51–63.
- PARK, H., Y., KIM, K., K., JIN, L., LEE, S.-T. (2006): *Microbacterium paludicola* sp. nov., a novel xylanolytic bacterium isolated from swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:3, 535-539. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63945-0>
- PENALOZA-VAZQUEZ, A., MENA, G., L., HERRERA-ESTRELLA, L. AND BAILEY, A., M. (1995): Cloning and Sequencing of the Genes Involved in Glyphosate Utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:2, 538-543. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.538-543.1995>
- PENG, H., YIN, H., DENG, J., CHEN, S.-N., HE, B.-Y. & ZHANG, N. (2012): Biodegradation of Benzo[a]pyrene by *Arthrobacter oxydans* B4. *Pedosphere*, 22:4, 554–561. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60040-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60040-X)
- PENG, X., ZHANG, J., S., LI, Y., Y., LI, W., XU, G., M., & YAN, Y., C. (2008): Biodegradation of insecticide carbofuran by *Paracoccus* sp. YM3. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43, 588-594. <https://doi.org/10.1080/03601230802234492>

- PERELO, L., W. (2010): Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 177:1-3, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.090>
- PÉREZ, J., DOMINGUES, I., MONTEIRO, M., SOARES, A., M., V., M., LOUREIRO, S. (2013): Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 4671-4680. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1443-6>
- PERSOONE, G., COLIN, J., DE COEN, W. (2000): New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, ISBN: 978-1-4613-6924-0.
- PESTICIDE ACTION NETWORK (2019): Parliament Urges the Commission to Take Regulatory Action on EDCs without Delay. <https://www.pan-europe.info/press-releases/2019/04/parliament-urges-commission-take-regulatory-action-edcs-without-delay>
- PESTICIDE PROPERTIES DATABASE (PPDB) UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE (2020): Mesotrione (Ref: ZA 1296) Environmental Fate – Ecotoxicology – Human Health, General information for mesotrione. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/442.htm>
- PETHŐ, Á. (2015): Növényvédő szer felhasználás Magyarországon. – Vízgyűjtő-gazdálkodási Terv - 2015, A Duna-vízgyűjtő magyarországi része. NÉBIH, Budapest, 2015. január.
- PIANCINI, L., D., S., GUILOSKI, I., C., SILVA DE ASSIS, H., C., CESTARI, M., M. (2015): Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. *Toxicology Reports*, 2, 1157-1163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.08.007>
- PICCIRILLO, C., PEREIRA, S., I., A., MARQUES, A., P., G., C., PULLAR, R., C., TOBALDI, D., M., PINTADO, M., E., CASTRO, P., M., L. (2013): Bacteria immobilisation on hydroxyapatite surface for heavy metals removal. *Journal of Environmental Management*, 121, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.02.036>
- PILEGGI, M., PILEGGI, S., A., V., OLCANHESKI, L., R., DA SILVA, P., A., G., GONZALEZ, A., M., M., KOSKINEN, W., C., BARBER, B., SADOWSKY, M., J. (2012): Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere*, 86, 1127-1132. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.041>
- PIPKER, R., AMRHEIN, N., JACOB, G., S., SCHAEFER, J. & KISHORE, G., M. (1987): Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. *European Journal of Biochemistry*, 165: 267–273. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11437.x>
- POIGER, T., MÜLLER, M., D., BUSER, H.-R. (2002): Verifying the Chiral Switch of the Pesticide Metolachlor on the Basis of the Enantiomer Composition of Environmental Residues. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 56:6, 300–303. <https://doi.org/10.2533/000942902777680388>.
- POLLEGIONI, L., SCHÖNBRUNN, E., SIEHL, D. (2011): Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. *FEBS Journal* 278:2753-2766. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>
- POPP, M., HANN, S., MENTLER, A., FUERHACKER, M., STINGEDER, G., KOELLENSPERGER, G. (2008): Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC-ICP-DRC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 695–699. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2037-5>.

- QU, Y., SHEN, E., MA, Q., ZHANG, Z., LIU, Z., SHEN, W., WANG, J., LI, D., LI, H., ZHOU, J. (2015): Biodegradation of indole by a newly isolated *Cupriavidus* sp. SHE. *Journal of Environmental Sciences*, 34, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.01.023>
- QUINN, J., P., PEDEN, J., M., M. & DICK, R., E. (1989): Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 283–287.
- RAJA, C., E. & OMINE, K. (2011): Arsenic, boron, and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. *African Journal of Biotechnology*, 11:9, 2267-2275. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3131>
- RAMOS, J.-L., MARQUÉS, S., VAN DILLEWIJN, P., ESPINOSA-URGEL, M., SEGURA, A., DUQUE, E., KRELL, T., RAMOS-GONZÁLEZ, M.-I., BURSAKOV, S., ROCA, A., SOLANO, J., FERNÁNDEZ, M., NIQUI, J., L., PIZARRO-TOBIAS, P., WITTICH, R.-M. (2011): Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 29:12, 641-647. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.007>
- RELYEA, A., R. & JONES, K., D. (2009): The Toxicity Of Roundup Original Max® To 13 Species Of Larval Amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9):2004-2008. <https://doi.org/10.1897/09-021.1>
- RICHARD, S., MOSLEMI, S., SIPAHUTAR, H., BENACHOUR, N., SÉRALINI, G., E. (2005): Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113:716–720. <https://doi.org/10.1289/ehp.7728>
- RISA, A., KRIFATON, CS., KUKOLYA, J., KRISZT, B., CSERHÁTI, M., TÁNCICS, A. (2018): Aflatoxin B1 and Zearalenone-Detoxifying Profile of *Rhodococcus* Type Strains. *Current Microbiology*, 75, 907-917. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1465-5>
- RIVARD, L. (2003): Environmental fate of Metolachlor. California Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring Branch Factsheet 14. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/envfate.htm>
- ROLLOF, B., BELLUCK, D., MEISNER, L. (1992): Cytogenetic effects of cyanazine and metolachlor on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutation Research Letters*, 281:4, 295–298. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90024-C](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90024-C)
- ROMANO, R., M., ROMANO, M., A., BERNARDI, M., M., FURTADO, P., V., OLIVEIRA, C., A. (2010): Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology*, 84:309–317. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0494-z>
- ROUBEIX, V., FAUVELLE, V., TISON-ROSEBERY, J., MAZZELLA, N., COSTE, M., DELMAS, F. (2012): Assessing the impact of chloroacetanilide herbicides and their metabolites on periphyton in the Leyre River (SW France) *via* short term growth inhibition tests on autochthonous diatoms. *Journal of Environmental Monitoring*, 14, 1655-1663. <https://doi.org/10.1039/C2EM10887A>
- ROUCHAUD, J., NEUS, O., COOLS, K. & BULCKE, R. (2000): Dissipation of the triketone mesotrione herbicide in the soil of corn crops grown on different soil types. *Toxicology & Environmental Chemistry*, 77(1-2): 31-40. <https://doi.org/10.1080/02772240009358936>
- ROUTLEDGE, E., J. & SUMPTER, J., P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:3, 241-248. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150303>

- ROZMÁNKOVÁ, E., PÍPAL, M., BLÁHOVÁ, L., CHANDRAN, N., N., MORIN, B., GONZALEZ, P., BLÁHA, L. (2020): Environmentally relevant mixture of S-metolachlor and its two metabolites affects thyroid metabolism in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 221, 105444. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105444>
- RUEDA-RUZAFÁ, L., CRUZ, F., ROMAN, P., CARDONA, D. (2019): Gut microbiota and neurological effects of glyphosate. *Neurotoxicology*, 75, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.08.006>.
- RUSIECKI, J., A., HOU, L., LEE, W., J., BLAIR, A., DOSEMECI, M., LUBIN, J., H., BONNER, M., SAMANIC, C., HOPPIN, J., A., SANDLER, D., P., ALAVANJA, M., C., R. (2006): Cancer incidence among pesticide applicators exposed to metolachlor in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer*, 118:12, 3118–3123. <https://doi.org/10.1002/ijc.21758>.
- SABDONO, A. (2006): Biodegradation of Chlorpyrifos by a Marine Bacterium *Bacillus firmus* Strain BY6 Associated with Branching Coral *Acropora* sp. *Journal of Coastal Development*, 10:2, 115-123. ISSN 1410-5217.
- SALMERÓN-ALCOCER, A., RUIZ-ORDAZ, N., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., GALÍNDEZ-MAYER, J. (2007): Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed microbial culture constituted by *Burkholderia* sp., *Microbacterium phyllosphaerae*, and *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37:2, 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.04.015>
- SANDOVAL-CARRASCO, C., A., AHUATZI-CHACÓN, D., GALÍNDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. (2013): Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 145, 33–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.068>
- SANSEVERINO, J., ELDRIDGE, M., L., LAYTON, A., C., EASTER, J., P., YARBROUGH, J., SCHULTZ, T., W., SAYLER, G., S. (2009): Screening of Potentially Hormonally Active Chemicals Using Bioluminescent Yeast Bioreporters. *Toxicological Sciences*, 107:1, 122-134. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn229>.
- SANSEVERINO, J., GUPTA, R., K., LAYTON, A., C., PATTERSON, S., S., RIPP, S., A., SAIDAK, L., SIMPSON, M., L., SCHULTZ, T., W., SAYLER, G., S. (2005): Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:8, 4455–4460. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4455-4460.2005>
- SBRILLI, G., BIMBI, B., CIONI, F., PAGLIAI, L., LUCHI, F., LANCIOTTI E. (2005): Surface and ground waters characterization in Tuscany (Italy) by using algal bioassay and pesticide determinations: comparative evaluation of the results and hazard assessment of the pesticides impact on primary productivity. *Chemosphere*, 58:5, 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.012>
- SCHÖNBRUNN, E., ESCHENBURG, S., SHUTTLEWORTH, W. A., SCHLOSS J. V., AMRHEIN, N., EVANS, J. N. S., KABSCH, W. (2001): Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS* 98(4):1376-1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376>
- SELVAPANDIYAN, A. & BHATNAGAR, R. (1994): Isolation of a glyphosate-metabolising *Pseudomonas*: detection, partial purification and localisation of carbon-phosphorus lyase. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 40, 876-882. <https://doi.org/10.1007/BF00173992>

- SHANER, D., L., BRUNK, G., BELLES, D., WESTRA, P., NISSEN, S. (2006): Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest Management Science*, 62:7, 617-623. <https://doi.org/10.1002/ps.1215>
- SHAPIR, N., MONGODIN, E., F., SADOWSKY, M., J., DAUGHERTY, S., C., NELSON, K., E., WACKETT, L., P. (2007): Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. *Journal of Bacteriology*, 189:3, 674-682. <https://doi.org/10.1128/JB.01257-06>
- SHIOMI, N. & AKO, M. (2012): Biodegradation of Melamine and Cyanuric Acid by a Newly-Isolated *Microbacterium* strain. *Advances in Microbiology*, 2, 303-309. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.23036>
- SIDOLI, P., LASSABATERE, L., ANGULO-JARAMILLO, R., BARAN, N. (2016): Experimental and modeling of the unsaturated transports of S-metolachlor and its metabolites in glaciofluvial vadose zone solids. *Journal of Contaminant Hydrology*, 190, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2016.04.001>
- SIHTMÄE, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.005>
- SINGH, B., K. & SINGH, K. (2014): Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology*, 245-261. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.929564>
- SINGH, B., K. & WALKER, A. (2006): Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30:3, 428-471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- SINGH, B., K. (2009): Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 156–163. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2050>
- SINGH, B., KAUR, J., SINGH, K. (2012): Microbial remediation of explosive waste. *Critical Reviews in Microbiology*, 38, 152–167. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.640979>
- SINGH, R., PAUL, D., JAIN, R., K. (2006): Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14:9, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001>
- SKARK, C., ZULLEI-SEIBERT, N., SCHOTTLER, U., SCHLETT, C. (1998): The occurrence of glyphosate in surface water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 70:93–104. <https://doi.org/10.1080/03067319808032607>
- 4SOLOMON, K., R., ANADÓN, A., CARASQUILLA, G., CERDEIRA, A., L., MARSHALL, J., SANIN, L.-H. (2007): Coca and poppy eradication in Colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 190, 43–125. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36903-7_2
- SOROKULOVA, I., KRUMNOW, A., GLOBA, L., VODYANOY, V. (2009): Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 1123-1126. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0587-y>
- STALIKAS, C., D. & KONIDARI, C., N. (2001): Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *Journal of Chromatography A*, 907:1-2. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01009-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01009-8)
- STEINRÜCKEN, H., C. & AMRHEIN, N. (1980): The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94: 1207–1212. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)90547-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)90547-1)

- STELTING, S., BURNS, R., G., SUNNA, A., VISNOVSKY, G., BUNT, C., R. (2012): Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: A stable inoculant for the bioremediation of atrazine. *Applied Clay Science*, 64, 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.12.006>
- ŠTĚPÁNOVÁ, S., PLHALOVÁ, L., DOLEŽELOVÁ, P., PROKEŠ, M., MARŠÁLEK, P., ŠKORIČ, M., SVOBODOVÁ Z. (2012): The Effects of Subchronic Exposure to Terbutylazine on Early Developmental Stages of Common Carp. *The Scientific World Journal*, 615920. <https://doi.org/10.1100/2012/615920>
- Stipičević, S., Galzina, N., Udiković-Kolić, N., Jurina, T., Mendaš, G., Dvoršćak, M., Petrić, I., Barić, K., Drevenkar, V. (2015): Distribution of terbutylazine and atrazine residues in crop-cultivated soil: the effect of herbicide application rate on herbicide persistence. *Geoderma*, 259–260, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.06.018>.
- STRONG, L., C., ROSENDAHL, C., JOHNSON, G., SADOWSKY, M., J., WACKETT, L., P. (2002): *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5973–5980. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5973-5980.2002>
- SUTTON, P., RICHARDS, C., BUREN, L., GLASGOW, L. (2002): Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. *Pest Management Science*, 58, 981-984. <https://doi.org/10.1002/ps.554>
- SVIRIDOV, A., V., SHUSHKOVA, T., V., ZELENKOVA, N., F., VINOKUROVA, N., G., MORGUNOV, I., G., ERMAKOVA, I., T., LEONTIEVSKY, A., A. (2012): Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:787-796. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3485-y>
- ŠYVOKIENĖ, J. & MICKĖNIENĖ L. (2011): Hydrocarbon-degrading bacteria associated with intestinal tract of fish from the Baltic Sea. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 19(3): 244-250. <https://doi.org/10.3846/16486897.2011.602559>
- SZABÓ, I., SZOBOSZLAY, S., KRISZT, B., HÁHN, J., HARKAI, P., BAKA, E., TÁNCSICS, A., KASZAB, E., PRIVLER, Z., KUKOLYA, J. (2011): *Olivibacter oleidegradans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a biofilter clean-up facility on a hydrocarbon-contaminated site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:12, 2861-2865. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026641-0>
- SZÉKÁCS, A. & DARVAS, B. (2012): Forty Years with Glyphosate. In: Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds, Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds. *InTech*. <https://doi.org/10.5772/32491>
- SZÉKÁCS, A. & DARVAS, B. (2018): Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science*, 6:1–35. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>
- SZÉKÁCS, I., FEJES, Á., KLÁTYIK, S., 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. *International Journal of Engineering & Technology*, 8:213–218. ISSN: 1307-6892
- TALBOT, H., W., JOHNSON, L., M. & MUNNECK, D., M. (1984): Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. isolated from environmental sources. *Current Microbiology*, 10: 255–259. <https://doi.org/10.1007/BF01577137>

- TASCA, A., L., PUCCINI, M., FLETCHER, A. (2018): Terbutylazine and desethylterbutylazine: Recent occurrence, mobility and removal techniques. *Chemosphere*, 202: 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.091>
- TAXVIG, C., HADRUP, N., BOBERG, J., AXELSTAD, M., BOSSI, R., BONEFELD-JØRGENSEN, E., C., VINGGAARD, A., M. (2013): *In vitro* - *in vivo* correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272:3, 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.028>
- TELEKEN, J., L., GOMES, E., C., Z., MARMENTINI, C., MOI, M., B., RIBEIRO, R., A., BALBO, S., L., AMORIM, E., M., P., BONFLEUR, M., L. (2019): Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1-8. <https://doi.org/10.1017/s2040174419000382>
- TERRATOX™ AQUA Pesticides and *Vibrio Fischeri* (*Vibrio*) Database. (2008). TerraBase Inc.
- TEUSCHLER, L., K. (2007): Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223:2, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.07.010>
- THION, C., CÉBRON, A., BEGUIRISTAIN, T. & LEYVAL, C. (2012): PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68:28-35. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.012>
- THION, C., CÉBRON, A., BEGUIRISTAIN, T. & LEYVAL, C. (2013): Inoculation of PAH-degrading strains of *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* in rhizospheric sand and soil microcosms: microbial interactions and PAH dissipation. *Biodegradation*, 24:4, 569-581. <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9628-3>
- THONGPRAKAISANG, S., THANTANAWAT, A., RANGKADILOK, N., SURIYO, T., SATAYAVIVAD, J. (2013): Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59:129-136. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- THORPE, N. & SHIRMOHAMMADI, A. (2005): Herbicides and Nitrates in Groundwater of Maryland and Childhood cancers: A geographic information systems approach. *Journal of Environmental Science and Health, Part C.*, 23:2, 61-78. <https://doi.org/10.1080/10590500500235001>
- TIWARI, B., MANICKAM, N., KUMARI, S., TIWARI, A. (2016): Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. *Bioresource Technology*, 216, 1102-1105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.047>
- TIWARI, J., NAOGHARE, P., SIVANESAN, S., BAFANA, A. (2017): Biodegradation and detoxification of chloronitroaromatic pollutant by *Cupriavidus*. *Bioresource Technology*, 223, 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.043>
- TOMLIN, C. (2000): *The Pesticide Manual*. 12th edn. BCPC Publications, Surrey, UK.
- TÓTH, G. (2015): Gyomirtó szer hatóanyagok biodegradációjának és citotoxicitásának vizsgálata (Diplomadolgozat, Ökotoxikológus MSc). Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.

- TÓTH-CSANTAVÉRI, SZ., NAGY, V., RADVÁNYM B. (2014): Calaris Pro - A gyom feladja. Agrárágazat, Mezőgazdasági Havi Lap XV. évfolyam 3. szám
- TOULOUPAKIS, E., GIANNOUDI, L., PILETSKY, S., A., GUZZELLA, L., POZZONI, F., GIARDI, M., T. (2005): A multi-biosensor based on immobilizer Photosystem II on screen-printed electrodes for detection of herbicides in river water. *Biosensors and Bioelectronics*, 20:10, 1984-1992. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.035>
- TRASK, J., R., HARBOUR, C., M., JOHNSON, L., C., BALL, R., H. (2003): S-metolachlor monitoring data for community water systems in 43 states in 2002. In: Syngenta Crop Protection Report, (TO01 596-03).
- TREBST, A. (2008): The Mode of Action of Triazine Herbicides in Plants. In: *The Triazine Herbicides*, 355–385. <https://doi.org/10.1016/B978-044451167-6.50027-1>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- URBANCZYK, H., AST, J., C., HIGGINS, M., J., CARSON, J., DUNLAP, P., V. (2007): Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2823-2829. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65081-0>
- US EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1992): Pesticide tolerance proposed rule. Fed. Reg. 57, 8739–8740.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993): Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508W). R.E.D. Facts – Glyphosate. 1-7. EPA-738-F-93-011, September 1993.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1995): R. E. D. FACTS Terbutylazine. - Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508W). EPA-738-F-95-006A, 1995. June.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2001b): Metolachlor/S-metolachlor. - Toxicology Disciplinary Chapter for the Tolerance Reassessment Eligibility Decision (TRED) Document. 108800.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2016): Glyphosate issue paper: evaluation of carcinogenic potential. https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Federal Register, Rules and Regulations (2015): Mesotrione; Pesticide Tolerances. 80 FR 30625, EPA-HQ-OPP-2014-0303 FRL-9927-75. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2015-05-29/pdf/2015-12938.pdf>
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, OCSPP – Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2015): Weight of Evidence EDSP: Glyphosate.

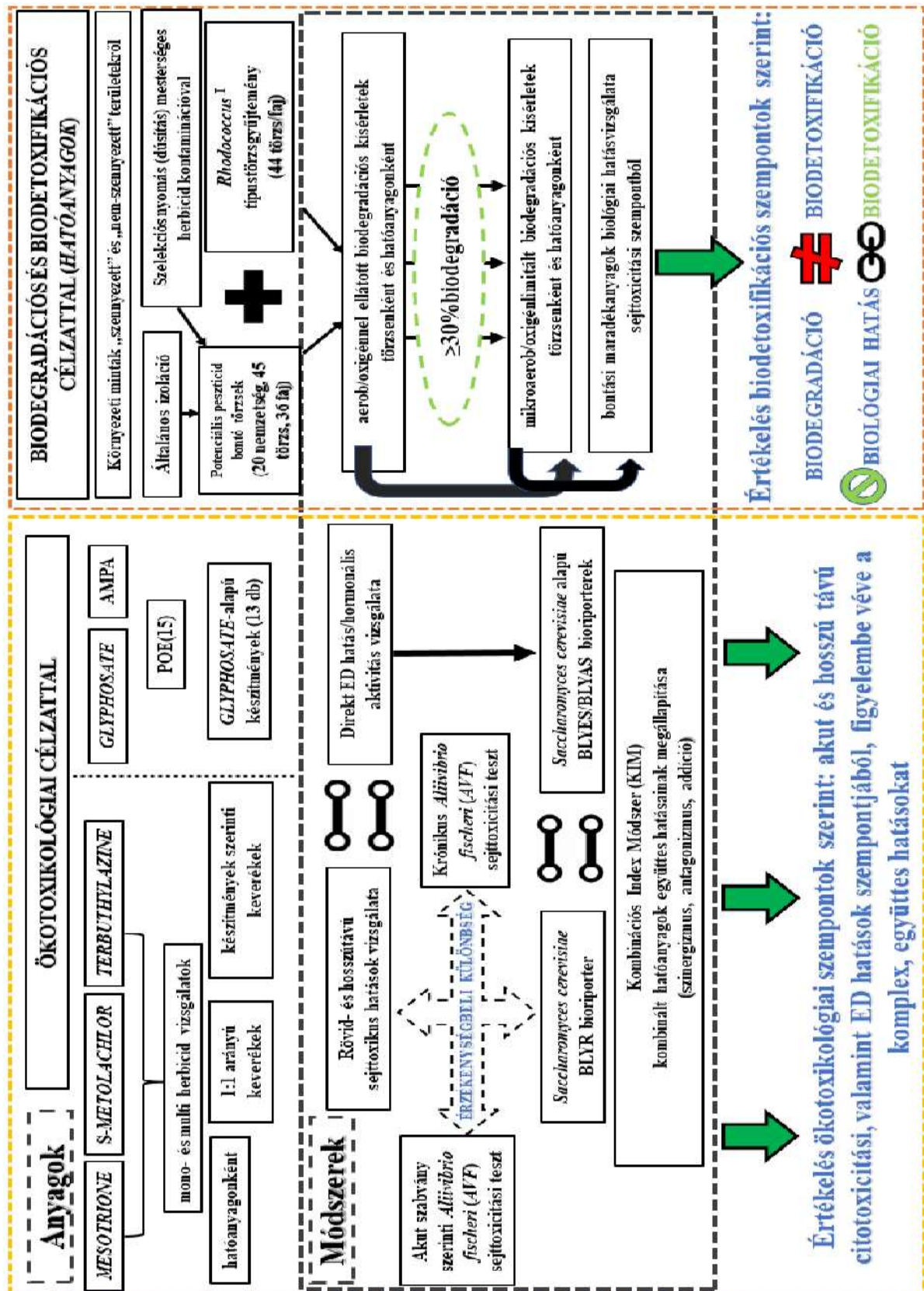
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Office of Pesticide Programs, Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential (2017): Annual Cancer Report 2017. http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (2001a): Mesotrione in/on Field Corn. Health Effects Division (HED) Risk Assessment. Memorandum.
- VAN BRUGGEN, A., H., C., HE, M., M., SHIN, K., MAI, V., JEONG, K. C., FINCKH, M., R., MORRIS, J., G., JR. (2018): Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616-617, 255-268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- VANDENBERG, L., N., BLUMBERG, B., ANTONIOU, M., N., BENBROOK, C., M., CARROLL, L., COLBORN, T., EVERETT, L., G., HANSEN, M., LANDRIGAN, P., J., LANPHEAR, B., P., MESNAGE, R., VOM SAAL, F., S., WELSHONS, W., V., MYERS, J., P. (2017): Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 71:613–618. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>
- VELISEK, J., STARA, A., ZUSKOVA, E., KUBEC, J., BURIC, M., KOUBA, A. (2019): Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 153, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.11.007>
- VELISEK, J., STARA, A., ZUSKOVA, E., KUBEC, J., BURIC, M., KOUBA, A. (2018): Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic, development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. *Science of The Total Environment*, 643:1, 1456-1463. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.309>
- VERA-CANDIOTI, J., SOLONESKI, S., LARRAMENDY, M., L. (2013): Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89:166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.028>
- VERECKEN, H. (2005): Mobility and leaching of the glyphosate: a review. *Pesticide Management Science*, 61, 1139-1151. <https://doi.org/10.1002/ps.1122>
- VILLA, S., MIGLIORATI, S., MONTI, G., S., VIGHI, M. (2012): Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). II: Response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.030>.
- VIÑAS, M., SABATÉ, J., ESPUNY, M., J., SOLANAS, A., M. (2005): Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7008-7018. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005>
- WACKET, L., P., SHAMES, S., L., VENDITTI, C., P. & WALSH, C., T. (1987): Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *Journal of Bacteriology*, 169: 710–717. <https://doi.org/10.1128/jb.169.2.710-717.1987>.
- WALSH, L., P., MCCORMICK, C., MARTIN, C., STOCCO, D., M. (2000): Roundup Inhibits Steroidogenesis by Disrupting Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein Expression. *Environmental Health Perspectives*, 108:769–776. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108769>

- WANG, C., HARWOOD J., D., ZHANG, Q. (2018): Oxidative stress and DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicide mesotrione. *Chemosphere*, 193, 1080-1086. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.148>
- WANG, T., LIU, Y., WANG, D., LIN, Z., AN, Q., YIN, C., LIU, Y. (2016): The joint effects of sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Vibrio fischeri*: Differences between the acute and chronic mixed toxicity mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 310:55-67. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.061>
- WANG, X., WANG, X., LIU, M., ZHOU, L., GU, Z., ZHAO, J. (2015): Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients. *Desalination and Water Treatment*, 57:42, 19768-19775. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1106984>
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (1994): Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159., Geneva.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996): Metolachlor in Drinking-water. - Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2nd ed. Vol. 2.
- WIREN-LEHR, V., S, KOMOBA, D., GLABGEN, W., E., SANDERMANN, H., JR., SCHEUNERT, I. (1997): Mineralization of [14C] glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems. *Pesticide Science*, 51:4, 436–442. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199712\)51:4<436:::AID-PS630>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199712)51:4<436:::AID-PS630>3.0.CO;2-7)
- WOODBURN, A., T. (2000): Glyphosate: production, pricing and use. *Pest Management Science*, 56: 309–312.
- WU, X., WANG, W., LIU, J., PAN, D., TU, X., LV, P., WANG, Y., CAO, H., WANG, Y., HUA, R. (2017): Rapid Biodegradation of the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 18, 3711-3720. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00544>
- XENOFONTOS, E., TANASE, A.-M., STOICA, I., VYRIDES, I. (2016): Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal. *New Biotechnology*, 33:2, 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.003>
- XIAO, X., XU, C.-C., WU, Y.-M., CAI, P.-J., LI, W.-W., DU, D.-L., YU, H.-Q. (2012): Biodecolorization of Naphthol Green B dye by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions. *Bioresource Technology*, 110, 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.099>
- XIAO, Y., CHEN, S., GAO, Y., HU, W., HU, M., ZHONG, G. (2015): Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2849–2859. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6164-y>
- XU, G., ZHENG, W., LI, Y., WANG, S., ZHANG, J., YAN, Y. (2008b): Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62:1, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.001>
- XU, J., YANG, M., DAI, J., CAO, H., PAN, C., QIU, X., XU, M. (2008a): Degradation of acetochlor by for microbial communities. *Bioresource Technology*, 99, 7797-7802. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.060>
- XU, T., YOUNG, A., NARULA, J., SAYLER, G. & RIPP, S. (2020): High-Throughput Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds Using BLYES and BLYAS Bioluminescent Yeast Bioassays.

- XU, Y. & LU, M. (2010): Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 183:1-3, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038>
- YANG, G., CHEN, C., WANG, Y., PENG, Q., ZHAO, H., GUO, D., WANG, Q., QIAN, Y. (2017): Mixture toxicity of four commonly used pesticides at different effect levels to the epigeic earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.037>.
- YAO, X.-F., KHAN, F., PANDEY, R., PANDEY, J., MOURANT, R., G., JAIN, R., K., GUO, J.-H., RUSSEL, R., J., OAKESHOTT, J., G., PANDEY, G. (2011): Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megaterium* IMT21. *Microbiology*, 157, 721-726. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045393-0>
- YAO, Y., TANG, H., SU, F., XU, P. (2015): Comparative genome analysis reveals the molecular basis of nicotine degradation and survival capacities of *Arthrobacter*. *Scientific Reports*, 5:8642. <https://doi.org/10.1038/srep08642>
- YOUNG, F., HO, D., GLYNN, D., EDWARDS, V. (2015): Endocrine disruption and cytotoxicity of Glyphosate and Roundup in human JAr cells in vitro. *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology*, 1:71–77. <https://doi.org/10.15761/iptg.1000114>
- YUDONO, B., SAID, M., SABARUDDIN, NAPOLEON, A., UTAMI, M., B. (2010): Kinetics of Petroleum-Contaminated Soil Biodegraded by An Indigenous Bacteria *Bacillus megaterium*. *Journal of Biosciences*, 17:4, 155-160. <https://doi.org/10.4308/hjb.17.4.155>
- ŽELJEŽIĆ, D., ŽUNEC, S., BJELIŠ, M., BENKOVIĆ, V., MLADINIĆ, M., TARIBA, B., L., PAVIČIĆ, I., ČERMAK, A., M., M., KAŠUBA, V., MILIĆ, M., PIZENT, A., VRDOLJAK, A., L., KOPJAR, N. (2018): Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbuthylazine on DNA integrity in human and mouse cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 19065-19081. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2046-7>
- ZEMOLIN, C., R., AVILA, L., A., CASSOL, G., V., MASSEY, J., H., CAMARGO, E., R. (2014): Environmental fate of S-metolachlor - A review. *Planta Daninha*, 32:3, 655–664. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582014000300022>
- ZHAN, X., M., JUN, L., MIAO, Y., G., LIU, W., P. (2006): A comparative study of rac- and S-metolachlor on some activities and metabolism of silkworm, *Bombyx mori* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.12.003>.
- ZHANG, B., NI, Y., LIU, J., TAN, T., ZHU, X., LI, Q., X., HUA, R., PAN, D., WU, X. (2020): Bead-immobilized *Pseudomonas stutzeri* Y2 prolongs functions to degrade s-triazine herbicides in industrial wastewater and maize field. *Science of The Total Environment*, 731, 139183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139183>
- ZHANG, H., SUN, H., YANG, R., LI, S., ZHOU, M., GAO, T., AN, L., CHEN, X., DYSON, P. (2016): Complete genome sequence of a psychrotrophic *Pseudarthrobacter sulfonivorans* strain Ar51 (CGMCC 4.7316), a novel crude oil and multi benzene compounds degradation strain. *Journal of Biotechnology*, 231, 81-82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.010>

- ZHANG, J., ZHENG, J.-W., LIANG, B., WANG, C.-H., CAI, S., NI, Y.-Y., HE, J. AND LI S.-P. (2011): Biodegradation of Chloroacetamide Herbicides by *Paracoccus* sp. FLY-8 *in Vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:9, 4614-4621. <https://doi.org/10.1021/jf104695g>
- ZHANG, Q., SALEEM, M., WANG, C. (2019): Effects of biochar on the earthworm (*Eisenia foetida*) in soil contaminated with and/or without pesticide mesotrione. *Science of The Total Environment*, 671, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.364>
- ZHAO, J., TANG, X., WANG, D., GAN, X., HUA, R. (2011): Isolation and identification of malathion-degrading strain of *Brevundimonas diminuta*. *2011 International Conference on Electrical and Control Engineering*, 1600-1602. <https://doi.org/10.1109/ICECENG.2011.6058363>
- ŽIVKOVIĆ SEMREN, T., ŽUNEC, S. AND PIZENT, A. (2018): Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69:2, 109-125. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3118>

M2. Doktori kutatómunkám során különböző célzattal megfogalmazott feladatok és azok végrehajtásához szükséges vizsgálatok folyamatábrája.



M3. Az *Aliivibrio fischeri* tápoldatának (Bacto Marine Broth – BMB, DIFCO 2216) összetétele.

BMB (1000 mL desztillált vízre számolva; pH=7,6 ± 0,2)	
Na-citrát	0,10 g
NaCl	19,45 g
MgCl ₂	6,68 g
Na ₂ SO ₄	3,24 g
CaCl ₂	1,80 g
KCl	0,55 g
NaHCO ₃	0,16 g
KBr	0,08 g
H ₃ BO ₃	2,20 g
NaF	0,24 g
(NH ₄) NO ₃	0,16 g
Na ₂ HPO ₄	0,80 g

M4. *Saccharomyces cerevisiae* (BLYES, BLYAS, BLYR) YMM (Yeast Mineral Medium) tápoldatának összetétele.

YMM (500 mL-re számolva)	
12. oldat (MM Medium)	427,25 mL
13. oldat (glükóz)	50 mL
14. oldat (L-aszparaginsav)	12,5 mL
15. oldat (L-treonin)	4 mL
16. oldat (CuSO ₄)	1,25 mL
VI. oldat (vitamin)	5 mL

I. MM oldat (1000 mL desztillált vízre számolva)	
KH ₂ PO ₄	13,61 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
KOH	4,2 g
MgSO ₄	0,2 g
FeSO ₄	1 mL (40 mg/50 mL H ₂ O)
L-hisztidin	50 mg
Adenin	50 mg
L-arginin-HCl	20 mg
L-metionin	20 mg
L-tirozin	30 mg
L-izoleucin	30 mg
L-lizin-HCl	30 mg
L-fenilalanin	25 mg
L-glutaminsav	100 mg
L-valin	150 mg
L-szerin	375 mg
II. glükóz oldat (80 mL desztillált vízre számolva)	
D-glükóz	20 g
III. L-aszparaginsav oldat (50 mL desztillált vízre számolva)	

L-aszparaginsav	200 mg
IV. L-treonin oldat (10 mL desztillált vízre számolva)	
L-treonin	240 mg
V. CuSO₄ oldat (50 mL desztillált vízre számolva)	
CuSO ₄	374,5 mg
VI. Vitamin oldat (100 mL desztillált vízre számolva)	
Tiamin	4 mg
Piridoxin	4 mg
Pantoténsav	4 mg
Inozitol	20 mg
Bioton (B ₁₂)	10 mg

M5. A ceglédi mintavételi terület (VIII. tábla) permetezési naplója 2005-től 2016-ig.

Kijuttatás időpontja	Készítmény	Aktív hatóanyag	Készítmény aktív hatóanyag tartalma	Kijuttatott dózis egy hektárra	Kezelt kultúra
2005.05.11.	Artea [®] (fungicid)	<i>propiconazole</i> <i>cyproconazole</i>	250 g/L 80 g/L	0,5 g/L	őszi árpa
	Granstar [®] 75 DF (herbicide)	<i>tribenuron-methyl</i>	75 m/m %	20 g	
	Folicur [®] (fungicid)	<i>tebuconazole</i>	430 g/L	4 g/L	
	Trend [®] (nedvesítő szer)	ethoxi izodecil alkohol	90 m/m %	0,01 m/m %	
2005.06.06.	Eminent [®] (fungicid)	<i>tetraconazole</i>	125 g/L	1 g/L	őszi árpa
	Hyspray [®] (tapadásfokozó)	etoxilált zsíramin	800 g/L	0,5 g/L	
	Karate Zeon [®] (inszekticid)	<i>lambda-cyhalothrin</i>	50 g/L	0,2 g/L	
2006.04.28.	Merlin [®] SC (herbicide)	<i>isoxaflutole</i>	480 g/L	0,2 g/L	takarmány kukorica
	Guardian Max [®] (herbicide)	<i>acetochlor</i>	640 g/L	2,4 g/L	
2007.04.03.	Granstar [®] 75 DF (herbicide)	<i>tribenuron-methyl</i>	75 m/m %	15 g	őszi búza
	Acanto [®] (fungicid)	<i>picoxystrobin</i> <i>cyproconazole</i>	200 g/L 80 g/L	-	
	Trend [®] (nedvesítő szer)	ethoxi izodecil alkohol	90 m/m %	0,01 m/m %	
2007.06.02.	Alert [®] (fungicid)	<i>flusilazole</i> <i>carbendazim</i>	125 g/L 250 g/L	1 g/L	őszi búza
	Hyspray [®] (tapadásfokozó)	etoxilált zsíramin	800 g/L	0,5 g/L	
	SumiGuard [®] EC (inszekticid)	<i>alpha-cypermethrin</i>	-	0,3 g/L	
2008.04.28.	Pulsar [®] 40 SL (herbicide)	<i>imazamox</i>	40 g/L	1 g/L	lucerna
2009.03.20.	Sencor [®] WG (herbicide)	<i>metribuzin</i>	70 w/w %	1 kg	lucerna

2010.03.17.	Metriphar® (herbicide)	<i>metribuzin</i>	70 w/w %	1 kg	lucerna
2011.03.02.	Metriphar® (herbicide)	<i>metribuzin</i>	70 m/m %	1 kg	lucerna
2012.03.13.	Refine® 50 SX (herbicide)	<i>thifensulfuron-methyl</i>	50 m/m %	30 g/ha	lucerna
	Trend® (nedvesítő szer)	etoxi izodecil alkohol	90 m/m %	0,01 m/m %	
2012.05.22.	Clinic® 480 SL (herbicide)	<i>glyphosate</i>	480 g/L	0,3 g/L	
2012.06.07.	Clinic® 480 SL (herbicide)	<i>glyphosate</i>	480 g/L	0,3 g/L	
2013.05.19.	Racer® (herbicide)	<i>flurochloridone</i>	250 g/L	2,5 g/L	
2013.07.03.	Acanto Plus® (fungicide)	<i>picoxystrobin</i> <i>cyproconazole</i>	200 g/L 80 g/L	1 g/L	hibrid napraforgó, silócirok
2013.08.02.	Trezor® 535 SC (fungicide)	<i>trifloxystrobin</i> <i>cyproconazole</i>	375 g/L 160 g/L	0,4 g/L	
	Biscaya® (inszekticide)	<i>thiacloprid</i>	244 g/L	0,3 g/L	
	Silver Star® (tapadásfokozó)	heptametil-trisziloxán polialkilénoxiddal	80 m/m % 20 m/m %	0,5 m/m %	
2013.08.28.	Tanos® 50 DF (fungicide)	<i>cymoxanil</i> <i>famoxadone</i>	25 m/m % 25 m/m %	0,4 m/m %	
	Silver Star® (tapadásfokozó)	heptametil-trisziloxán polialkilénoxiddal	80 m/m % 20 m/m %	0,5 m/m %	
2013.09.18.	Bordóilé + kén Neo SC® (fungicide)	tribázikus rézszulfát	350 g/L	5 g/L	
2013.09.25.	Reglone Air® (herbicide)	<i>diquat-ion</i> <i>diquat dibromide</i>	200 g/L 374 g/L	2 g/L	
	Mist Control® (elsodródás gátló)	poliakrilamid- kopolimer	2 m/m %	0,5 m/m %	
2014.05.06.	Yamato® (fungicide)	<i>tetraconazole</i> <i>thiophanate-methyl</i>	70 g/L 233 g/L	1,7 g/L	őszai búza
	Cyperkill® 25 EC (inszekticide)	<i>cypermethrin</i>	250 g/L	0,15 g/L	
2014.05.19.	Sólyom® 460 E (fungicide)	<i>tebuconazole</i> <i>triadimenol</i> <i>spiroxamine</i>	167 g/L 43 g/L 250 g/L	0,6 g/L	
2015.05.05.	Adengo® (herbicide)	<i>isoxaflutole</i> <i>thiencarbazone-methyl</i> <i>cyprosulfamide</i>	225 g/L 90 g/L 150 g/L	0,42 g/L	takarmány kukorica
	Monsoon® (herbicide)	<i>foramsulfuron</i> <i>isoxadiphen-ethyl</i>	22,5 g/L 22,5 g/L	2,5 g/L	
2016.05.05.	Caluma® (herbicide)	<i>mesotrione</i>	480 g/L	0,25 g/L	
	Click Combi® (herbicide)	<i>dimethenamid-P</i> <i>terbutylazine</i>	265 g/L 300 g/L	2,5 g/L	

M6. A ceglédi mintavételi terület (VIII. tábla) közelében, a központi területi táblákon kijuttatott, szempontomból releváns gyomirtó szer készítmények.

Készítmény	Aktív hatóanyag	Készítmény aktív hatóanyag tartalma	Kijuttatható aktív hatóanyag egy hektárra	Kezelt kultúra
Gardoprim Plus Gold® (herbicide)	<i>S-metolachlor</i> <i>terbuthylazine</i>	312 g/L 187 g/L	1248 g/L 748 g/L	kukorica
Lumax® (herbicide)	<i>mesotrione</i> <i>S-metolachlor</i> <i>terbuthylazine</i>	37,5 g/L 375 g/L 125 g/L	187 g/L 1875 g/L 625 g/L	
Principal Gold Plus® (herbicide)	<i>nicosulfuron</i> <i>rimsulfuron</i> <i>dicamba</i> <i>pethoxamide</i> <i>terbuthylazine</i>	92 g/kg 23 g/kg 550 g/kg 300 g/L 187,5 g/L	440 g	
Sucessor T® (herbicide)	<i>pethoxamide</i> <i>terbuthylazine</i>	300 g/L 187,5 g/L	1200 g/L 750 g/L	
Dual Gold® 960 EC (herbicide)	<i>S-metolachlor</i>	960 g/L	1536 g/L	
Roundup® Mega (herbicide)	<i>glyphosate</i>	551 g/L	2755 g/L	

M7. A Mineral Medium ásványosó tápoldat (OIR-III) tápoldat összetétele.

OIR-III (1000 mL desztillált vízre számolva)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01 g
Pepton	0,5 g
Élesztőkivonat	0,5 g

M8. A Luria-Bertani (LB) táptalaj összetétele.

LB (1000 mL desztillált vízre számolva)	
Tripton	10,0 g
Élesztőkivonat	5,0 g
NaCl	9,0 g
Bakterológiai agar	18,0 g

M9. A TGE-5 táptalaj összetétele.

TGE-5 (1000 mL desztillált vízre számolva)	
Tripton	5,0 g
Élesztőkivonat	2,5 g
D-glükóz	5,0 g
Bakterológiai agar	18,0 g

M10. FAHY tápoldat összetétele.

„A” oldat (100 mL) (1000 mL desztillált vízre számolva és szűrve)	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5,0 g
CaCl ₂ x H ₂ O	1,0 g
„B” oldat (100 mL) (1000 mL desztillált vízre számolva és autoklávozva)	
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
NH ₄ NO ₃	10,0 g
„C” oldat (1 mL) (1000 mL desztillált vízre számolva és szűrve)	
FeSO ₄ x 7H ₂ O	10,0 g
Na ₂ EDTA x 3H ₂ O	0,64 g
ZnCl ₂	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,015 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,175 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,15 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,02 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,01 g
10 µL biotin	
1 mL B ₁ vitamin	
10 µL B ₁₂ vitamin	
+ 800 mL desztillált vízzel kiegészítve	

M11. A vizsgált *glyphosate*-alapú herbicid készítmények vízi élőlényekre megállapított ökototoxicitása a biztonságtechnikai adatlapjuk alapján (MSDS).

Készítmény neve	Ökototoxicitás	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (LC ₅₀ [mg/L], 96 óra)	<i>Daphnia magna</i> (EC ₅₀ [mg/L], 48 óra)
Barclay Gallup Biograde 360 [®]	>326	>317
Boom Efekt [®]	>322	>1000
Fozát 480 [®]	21,6	113,9
Gladiátor 480 SL [®]	86 (aktív hatóanyag)	780 (aktív hatóanyag)
Glialka Express 6H [®]	502	323
Kapazin [®]	>100	>100
Roundup [®] Classic	8,2	11
Total [®]	29,3	76,2
Glialka Star [®]	28	69
Roundup [®] Mega	28	69
Dominátor Extra 608 SL [®]	33,1	>120
Glyfos Dakar [®]	>100	>100
Medallon Premium [®]	800 (86 – aktív hatóanyag)	160

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Szoboszlai Sándornak és Dr. Háhn Juditnak, akik tudományos-kutatói pályámat mesterszakos korom óta segítik, irányítják, egyengetik. Köszönöm nekik a lassan egy évtizedes irányomba mutatott példás hozzáállásukat, feltétlen támogatásukat, mellyel a szakmai fejlődésemet és kutatásomat segítették. Tanácsaikkal, véleményükkel, iránymutatásukkal munkámat előre vitték és színesítették.

Témavezetőim mellett köszönettel tartozom Dr. Kriszt Balázsnak, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet intézetigazgató helyettesének, hogy a segítségével az intézet berkein belül dolgozhattam, biztosította a kutatói munkához szükséges háttérrel és biztonságot.

Köszönettel tartozom az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet jelenlegi és volt, összes munkatársának, akik segítettek és hozzájárultak a munkám sikerességéhez, kiemelve közülük Benséné Fekete Ildikót és Dr. Radó Júliát.

Nagyon köszönöm szüleimnek és testvéremnek a tanulmányaim során nyújtott odaadó, állandó támogatásukat és szeretetüket.

Végtelen hálával tartozom feleségemnek, akinek szeretete, megértése és lelki támogatása nélkül a dolgozatom nem valósulhatott volna meg, és aki nélkül nem lennék az, aki ma vagyok. Doktori munkámat szeretettel ajánlom fel neki és kisfiunknak, Zéténynek, akiből mindig erőt és többlet energiákat meríthetek.

Köszönettel tartozom a kutatómunkámat támogató pályázatoknak:

A GINOP 2.3.2.-15-2016-00004 számú: A balatoni horgászati célú halgazdálkodás fenntarthatóvá tételének megalapozása a halfauna rekonstrukciója és a táplálékbázis hasznosulásának vizsgálatával alap- és alkalmazott kutatási módszerekkel című pályázatnak.

A Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, az NVKP_16 pályázati program finanszírozásában megvalósult NVKP_16-1-2016-0023: Új kockázatkezelési modellrendszer fejlesztése a víz- és élelmiszerbiztonság növelése érdekében a haltermékvonalon, számú és című pályázatnak.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatásában létrejövő „Tématerületi Kiválósági Program 2020”, Nemzeti Kihívások Alprogram (TKP2020-NKA-16) keretében a - Szent István

Egyetem - Civilizációs eredetű veszélyek azonosítása és kezelése a létfontosságú rendszerek biztonságának növelése érdekében, különös tekintettel a dróntechnikai és szenzortechnológiai fejlesztésekre, valamint a vízbiztonsági és hidrotoxikológiai kutatásainak körében - számú és című pályázatnak.

A 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00239 számú projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a Piacvezérelt Kutatás-fejlesztési és Innovációs Projektek támogatása pályázati program finanszírozásában valósult meg.