



SZENT ISTVÁN EGYETEM  
BIOLÓGIATUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Nano- és nagyszemcsés cink-oxid ökotoxikológiai  
vizsgálata  
talajlakó szervezeteken**

Kiss Lola Virág

Gödöllő  
2020

**A doktori iskola**

**megnevezése:** SZIE Biológiai Tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Biológia tudományok

**vezetője:** Dr. Nagy Zoltán  
egyetemi tanár, DSc  
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,  
Biológiai Tudományi Intézet

**Témavezetők:**  
**Dr. Nagy Péter István**  
egyetemi docens, PhD  
Biológiai Tudományi Intézet  
Állattani és Állatökológiai Tanszék

**Dr. Seres Anikó**  
egyetemi adjunktus, PhD  
Biológiai Tudományi Intézet  
Állattani és Állatökológiai Tanszék

.....  
**Dr. Nagy Zoltán jóváhagyása**      **Dr. Nagy Péter István jóváhagyása**

.....  
**Dr. Seres Anikó jóváhagyása**

Ez az értekezés tézise 15 példányban készült. Ez a ... számú példány

# 1. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLOK

A nanoanyagok alkalmazási területe rendkívül széles, emiatt az utóbbi 30 év során gyakorlatilag mindenhol megjelentek. Felhasználhatják őket a kozmetikai iparban, a gyógyszeriparban, az élelmiszeriparban, az elektronikai és az optikai eszközök gyártásakor. Emellett alkalmazzák a nanoszerkezeteket bizonyos káros molekulák megkötésére, rákkutatásban, növényvédelemben, talajremediáció illetve szennyvíztisztítás során és környezeti detektorokban is. A felhasználás során a méretcsökkenésből adódó megváltozott tulajdonságokat használják ki, ezzel szemben az ebből adódó lehetséges hátrányokkal és veszélyekkel korábban sokkal kisebb mértékben foglalkoztak. Ez a tendencia változóban van, egyre több a nanoanyagok mellékhatásaival foglalkozó vizsgálat, viszont a kutatási eredmények nehezen összehasonlíthatóak és megismételhetőek a különböző módszerek használata miatt, mivel elfogadott szabvány nem áll rendelkezésre. Emellett sok tesztelési hiba merül fel az elérhető kutatások vizsgálata során. Gyakori a felhasznált anyagok hiányos jellemzése, nem megfelelő koncentrációk használata vagy akár a szükséges kontroll csoportok kihagyása.

A nanoméretű fém-oxidokra jellemző a gyakori felhasználás többek között a különleges katalitikus aktivitásuk, az optoelektronikában felhasználható tulajdonságaik, valamint az erős antimikrobiális aktivitásuk miatt. A cink-oxid nanostruktúra az egyik leggyakrabban alkalmazott nanoanyag közülük. Fotokatalitikus és kémiai aktivitása magas, ezért környezeti kármentesítésre, mint pl. talajremediációra vagy víztisztításra is alkalmazzák, ami által ezek az anyagok közvetve és közvetlenül is bekerülhetnek a talajba. A nanoszemeses cink-oxid toxicitása több tulajdonságból eredhet, ilyen lehet a kioldódott cink-ionok, a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződése és a potenciálisan méretből adódó hatások, pl. az élőlények sejtjei és a nanorészecskék közötti közvetlen találkozások. A nZnO kibocsájtás az anyagok sokoldalú alkalmazhatóság miatt (pl.: víztisztítás, talajremediáció, orvosi felhasználás) előreláthatólag nem fog csökkenő tendenciát mutatni, annak ellenére sem, hogy rendkívül sok adat áll rendelkezésre a potenciális veszélyekről és kockázatokról. Ezáltal fontos feladattá vált a már kijutott vagy még legyártatlan anyagok megismerése és azok toxikus hatásainak csökkentése. Erre megfelelő módszer a negatív hatások olyan módú enyhítése vagy akár megszüntetése, hogy a számunkra előnyös tulajdonságok megmaradjanak különböző mitigáló anyagok segítségével. A nZnO esetében ilyenek lehetnek a különböző természetes szerves anyagok, bevonatok és akár antioxidánsok, mint például az aszkorbinsav vagy az N-acetilcisztein. További problémát jelenthet, hogy a

nagymennyiségű kibocsájtás miatt a melléktermékként, hulladékként vagy célzottan kikerült nanoanyagok véletlenszerűen keveredhetnek más anyagokkal vagy nanoanyagokkal. Ebben az esetben számtalan új anyag és anyagkombináció jöhet létre. Emellett a köztük létrejövő interakció során a keverékek alapanyagaitól függően megváltozhatnak a lehetséges hatások. Az ilyen jellegű vizsgálatok nagyon ritkák, annak ellenére, hogy rendkívül fontos információkat nyújthatnak a részecskeméretből adódó toxikus hatások vizsgálataiban.

A talajba jutó nano-fémoxidok drasztikus változásokon mehetnek keresztül, kötődhetnek a talajszemcsékhez, bekövetkezhet agglomeráció vagy aggregáció a részecskék között, reakcióba léphetnek a talajban található szerves anyagokkal vagy a talajvízbe is oldódhatnak. Ezért is nagyon fontos a közvetlen expozícióban is részesülő talajorganizmusokra kifejtett hatások vizsgálata a nanoszemcsés cink-oxid esetében, lehetőleg környezetileg releváns tesztközegben, hogy figyelembe tudjuk venni a talajt, mint befolyásoló tényezőt. A talajban élő szervezetek eltérően reagálhatnak a szennyezésekre, ezért is lényeges olyan indikátor fajok használata, amelyek különböző talajlakó élőlény csoportokat képviselnek. Természetesen ezzel a faj- vagy egyedszintű érzékenység nem képezhető le, mégis több információt nyújt az eltérő hatásokról, mintha csak egy-egy csoporton végeznénk a kísérleteket.

A nZnO talajfaunára kifejtett hatásait összegyűjtő tanulmány alapján a legmagasabb kockázatnak a mikrofaunába tartozó állatok vannak kitéve. A mikrofaunát nagyon jól reprezentálják a fonálféreg, mint tesztállatok. A fonálféreg ideális a laboratóriumi tesztek elvégzésére, mert kevés helyet igényelnek, könnyen kezelhetők és tenyésztethetők, emellett általában rövid élettartam jellemzi őket.

A mikrofauna mellett a mezofauna tagjai is erősen ki vannak téve a különböző talajszennyezések hatásainak. Az ugróvillások és azon belül a *Folsomia candida* faj használatos a legtöbb szabvány szerinti ökotoxikológiai vizsgálatnál. A *F. candida* rendkívül népszerű, mivel szűznemzéssel szaporodik és nagyon könnyen tartható laboratóriumi körülmények között.

## 1.1.Célkitűzések

- Különböző tesztközegek hatásának vizsgálata ökotoxikológiai tesztrendszerekben:
  - környezetileg releváns tesztközeg kísérleti fejlesztése *Panagrellus redivivus* tesztállaton a 15 nm és a 140 nm ZnO jelenlétében;
  - *Folsomia candida* teszt faj esetében a különböző expozíciós útvonalak (kutikulán keresztüli és orális valamint csak orális expozíciót engedélyező közegek) hatásának vizsgálata a két ZnO szemcse toxicitására;
- a szemcseméretbeli toxicitási különbségek kimutatása, a hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata a felhasznált ZnO részecskéknél:
  - N-acetilciszetin mitigációs ágens segítségével rámutatni a toxicitási mechanizmusban rejlő különbségekre;
  - interakciós kísérletek végzése a környezetben megtörténő keveredés okozta toxicitásbeli változások szimulálására és a szemcseméretbeli toxikus hatások specifikus vizsgálata céljából;
  - gyakorlatban is alkalmazható mérési módszer kifejlesztése a *P. redivivus* sejten belüli reaktív oxigén gyök mennyiségének a mérésére;
  - szemcseméretbeli toxicitási mechanizmusának vizsgálata a termelődött reaktív oxigén gyök mérés által.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. Tesztanyagok és vizsgálatuk

Vizsgálataim során két különböző szemcseméretű ZnO-dal dolgoztam (Gyártó: US Research Nanomaterials, Inc., Houston, TX Amerikai Egyesült Államok). A gyártó által meghatározott adatok szerint 10-20 nm (átlagosan 15 nm) 99 + % tisztaságú és 80-200 nm (átlagosan 140 nm) 99 + % tisztaságú részecskéket tartalmaznak. A dolgozatban a gyártó által megadott átlagos méreteket tüntetem fel. Mindkét anyag az úgynevezett nedves kémiai módszerrel készült és nem alkalmaztak rajtuk felületkezelést. A méreten kívül morfológia tekintetében is különböznek: a kisebb gömb alakú, míg a nagyobb irreguláris részecskéket tartalmaz. A 15 nm-es 20-60 m<sup>2</sup>/g, a 140 nm-es pedig 4,8-6,8 m<sup>2</sup>/g fajlagos felülettel rendelkezik. A kioldódott ionok hatásának megfelelő vizsgálatához ionos kontrollként ZnCl<sub>2</sub>-ot használtam, a mitigációs vizsgálatokhoz pedig N-acetilciszteint (Gyártó: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország).

Az elsődleges szemcseméret és morfológia felvételezése a 15, 140 nm ZnO részecskéről önállóan, a talajoldat és N-acetilcisztein hozzáadásával és a két anyag 50-50 % keverékéről pásztázó elektron mikroszkóppal (SEM, FEI Quanta 3D, ELTE, Magyarország) történt. Mindegyik vizsgálat a fonálféreg akut toxicitási vizsgálatoknál használt legnagyobb koncentráción történt (10,4 mg/l Zn). A kiértékelést Image J szoftverrel végeztem.

A kioldódott ionok mennyiségét minden kísérlet előtt megvizsgáltam. 5-5 ml törzsoldatot (10,4 mg/l Zn) vizsgáltam 24 és egyes esetekben 48 óra inkubáció után, a mérést induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria segítségével végeztem el.

### 2.2. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

#### 2.2.1. *Panagrellus redivivus* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek

Kíséréteimhez a *P. redivivus* tesztfajt választottam a mikrofauna reprezentálására. Tartásuk a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék laboratóriumában zabpelyhes táptalajon, sötét termosztátban 20 ± 1 °C történik (TS606-CZ/4-WAR, Németország). Kifejlett nőtény egyedekkel dolgoztam két különböző teszt közeget (Milli-Q víz és talajoldat) felhasználva. Az expozíciós időt kivéve (Milli-Q víz – 24 óra; talajoldat – 48 óra) a tesztek beállítása ugyanúgy történt. A talajoldatos tesztnél 24 óra alatt nem tapasztaltam mérhető hatást, így vált indokoltá a

hosszabbított expozíciós idő. Mivel a teszt nem szabványosított ökotoxikológiai teszt, az érvényességi küszöböt irodalmi adatok alapján úgy határoztam meg, hogy a kontroll csoportban a maximális elhullás nem lehet több 20%-nál. A tesztek során etetés nem történt. A két különböző szemcseméretű ZnO-ból és a ZnCl<sub>2</sub>-ből törzsoldatokat készítettem, majd 20 perc szonikálás után megalkottam a kísérleteknél felhasznált koncentráció sorozatokat. A végleges koncentrációk 0,32; 0,63; 1,26; 2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn voltak a Milli-Q víz esetében, megfelelve a 0,39; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5 mg/l ZnO-nak és 0,65; 1,31; 2,61; 5,23; 10,46 és 20,92 mg/l ZnCl<sub>2</sub>-nak. A talajoldattal végzett kísérleteknél előtesztek alapján kitapasztalt magasabb koncentrációkat használtam (1028,4; 2056,8; 4113,61; 8227,22 és 16454,5 mg/l Zn, megfelelve 1280; 2560; 5120; 10240 és 20480 mg/l ZnO-nak és 2141,72; 4283,44; 8566,88; 17133,77 és 34267,52 ZnCl<sub>2</sub>-nak), mivel ugyanabban a koncentráció tartományban a ZnCl<sub>2</sub> kivételével egyik anyagnál sem tapasztaltam szignifikáns hatást. A koncentrációkat próbáltam közelíteni az ugróvillás tesztekhez alkalmazottakhoz. Koncentrációnként és kontroll (negatív) csoportonként négy ismétlést alkalmaztam. A tesztek 96 lyukú mikrotitráló lemezekon végeztem (Bioster S.p.A., Italy), ismétlésenként 5 db kifejlett nőtényt használtam. A törzstenyészetből egy Milli-Q vizet tartalmazó számláló edénybe helyeztem random mintavétellel egy adag állatot. Innen válogattam ki pipetta segítségével a nőtény egyedeket. Mivel a tenyészetekben lévő állatok 90%-a nőtény, csak arra kellett figyelni, hogy hím állat ne kerüljön a kísérleti rendszerbe. A női ivarnyílás a hasoldal közepvonalaiban, míg a hímvivarnyílás a test hátsó végében helyezkedik el, ahol jól kivehető a rövid, hajlított párzótüske. Emellett a hímek általában kisebbek, mint a nőtények. Az állatok behelyezése előtt a nedves környezet megteremtése végett 100 µl Milli-Q vizet vagy talajoldatot pipettáztam a mikrotitráló lemezekre. Ezután, mindkét kísérletnél az állatokkal együtt kétszer 30 µl Milli-Q vizet helyeztem minden felhasználni kívánt küvettába. Mivel a küvettákban már volt folyadék mire az oldatokat hozzáadtam, ezért minden nominális koncentrációnak a dupláját készítettem el a kísérletek előtt. Ezekből 160 µl tesztoldat, vagy a kontroll csoport esetében további Milli-Q víz hozzáadása után végül minden küvettába összesen 320 µl folyadék került. A mikrotitráló lemezeket termosztátban sötét körülmények között, 20 ± 1 °C –on inkubáltam. A teszt végpontja a mortalitás volt, a tesztek leolvasását a Milli-Q vizes közeg esetében transzmissziós sztereomikroszkóp (Olympus SZH 10, Németország) alatt végeztem. Mivel a talajoldat vizsgálata során jóval magasabb koncentrációkat használtunk, ezért a ZnO részecskék minden esetben vastag réteget képeztek a lyukak alján, megnehezítve az alsó megvilágításban történő leolvasást. Így ezeknél a kísérleteknél felülről világitottam és számoltam meg a mintákban a túlélő egyedeket.

### 2.2.1.1. Módszerfejlesztés

Irodalmi adatok alapján a módszerben az állatokat üvegpipettával helyezték a 96 lyukú mikrotitráló lemezre. Mivel ezt a módszert túlzottan időigényesnek és pontatlannak találtam, áttértem az 5-200 µl-es pipetta használatára. Így az állatokat pontos folyadékmennyiséggel tudtam a kísérleti rendszerbe helyezni és kisebb gyakorlás után maga az áthelyezés is könnyedé válik, ami nagyon fontos volt nagy egyedszámú kísérletek beállításánál.

### 2.2.2. *Folsomia candida* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek és expozíciós útvonalak

A mezofaunából a *F. candida* tesztfajt választottam. Hasonlóan a *P. redivivus*-hoz, tartásuk sötét termosztátban ( $20 \pm 1$  °C) valósul meg, viszont ebben az esetben a Tanszéken használatos gipsz és aktív szén keverék (200 g gipsz/ 200 g víz/ 10 g aktív szén) szolgál a törzstenyészet táptalajául. Ezeknél a kísérleteknél is két különböző tesztközeggel, a gipsszel és mesterséges talajjal dolgoztam. A gipsz esetében az OECD 232-es szabvány módosított verzióját használtam fel. Előkísérletek alapján a törzstenyészetek talaját biztosító gipsz keverékkel dolgoztam a kísérletben is. Ezt műanyag Petri csészékbe helyeztem bele. A tesztanyagokat a kihelyezett táplálékhoz kevertem hozzá, nem a tesztközeghez, hogy biztosítani tudjam a kizárólagos *per os* expozíciót. Habár a gipsz tesztközegben található aktív szénből részben tudnak fogyasztani az állatok, előkísérletek alapján ezt a keveréket találtam megfelelőnek, Aktív szén hozzáadása nélküli tenyészetek túlélése csökken, emellett a leolvasást is rendkívül megnehezíti a szén hiánya. A táplálékként használt 0,5 g porélesztőhöz 1,5 ml tesztoldatot adtam és egy filter papíron a gipszes tesztközeg közepére helyeztem. Hetente egy alkalommal cseréltem az oldat-és táplálékkeveréket. A mesterséges talajon lezajlott kísérletet az OECD 232-es szabvány alapján végeztem. Tesztedényenként 25 g talajt és 5 ml oldatot vagy desztillált vizet (kontroll csoport) alkalmaztam. Mindkét vizsgálatnál azonos koncentrációkat használtam: 160,69; 321,37; 624,75; 1285,5 and 2571 mg/kg Zn. Ezek a koncentrációk megfelelnek 803,44; 1606,87; 3213,75; 6427,5 and 12855 mg/l Zn-nek, abban az esetben, ha a talajhoz és 3213,75; 6427,5; 12855; 25710 and 51420 mg/l Zn-nek, ha a táplálékhoz adott oldalra számoljuk át őket (ZnO-ra megfelelően: 200, 400, 800, 1600 és 3200 mg/kg ZnO, ZnCl<sub>2</sub>-ra megfelelően: 334,63; 669,25; 1338,5; 2677 és 5354 mg/kg ZnCl<sub>2</sub>). Koncentrációnként négy ismétlést és a kontroll csoportban (negatív) pedig nyolc ismétlést alkalmaztam mindkét vizsgálatnál. A szinkronizált korú állatok a törzstenyészetből leválogatott és elkülönített felnőtt egyedek



petéiből származtak. A felnőtteket 2-3 nap után eltávolítottam a szinkrontenyészetekről, hogy azonos korúak legyenek a kísérleti egyedek. Minden tesztedénybe 10 db 10-12 napos egyed került. A kísérleti idő letelte után (28 nap) a leolvasásnál a mesterséges talajos kísérletnél csapvízzel töltöttem meg az edényeket, majd tintával színeztem be, hogy jól láthatóak legyenek az állatok. Ezek után leszámoltam a túlélő adult egyedeket és a szaporulatot. A gipszen végzett tesztnél fényképeket készítettem minden koncentráció minden ismétléséről és Image J szoftver segítségével megsámoltam az adult és a juvenilis egyedeket.

## **2.3. Hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata**

### **2.3.1. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *Panagrellus redivivus*-ra**

A tesztközegek hatását vizsgáló kísérletek során született eredményekből kiindulva fontosnak találtam a felhasznált anyagok hatásmechanizmusának megismerését célzó kísérletek elvégzését is. A tesztek az általam elvégzett korábbi kísérletek alapján állítottam össze. Ezeknél a vizsgálatoknál már csak a *P. redivivus* tesztfajjal dolgoztam, a gyorsan elvégezhető, könnyen magyarázható eredményeket hozó kísérleti módszer miatt. A tesztidő 24 óra volt. A felhasznált koncentrációk majdnem minden esetben – kivéve az ionos cinkformánál – megegyeztek a Milli-Q vizes közegben végzett tesztekével (0,63; 1,26; 2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn). A ZnCl<sub>2</sub> koncentrációkat az általam előre lemerített kioldódott cink mennyiségek átlaga alapján határoztam meg (0,13; 0,26; 0,53; 1,06; 2,12 és 4,23 mg/l Zn). Minden koncentrációban és a kontroll csoportban is négy ismétlést alkalmaztam, ismétlésenként 5-5 állattal. Beállítottam egy negatív kontrollt (320 µl Milli-Q víz) és egy NAC-t tartalmazó kontrollt is (160 µl Milli-Q víz és 160 µl NAC). A 24 órás termosztátban töltött (sötét, 20 ± 1 °C) expozíciós idő után sztereomikroszkóp alatt vizsgáltam meg a túlélő egyedek számát. A kísérleteket elvégeztem a 15 és 140 nm szemcseméretű ZnO és ZnCl<sub>2</sub> alkalmazásával önmagukban és egy mitigáló ágens részvételével is. Az egyes toxikus hatások (például ROS termelés és/vagy oldott cink ionok hatása) mitigálására az N-acetylcisztein antioxidánst használtam fel. A NAC célja a kísérletekben a toxikus hatások csökkentése és ezáltal az ebben rejlő különbségek kiemelése volt. 10 mg/l-es koncentrációban törzsoldatot készítettem, majd ebből minden felhasználandó küvettába 100 µl-t pipettáztam. A mitigációs kísérletek esetében a törzstenyészetből kiemelt állatokat nem Milli-Q vízbe, hanem a 10 mg/l-es NAC oldatba helyeztem és innen történt a kiválogatásuk kétszer 30 µl vagy egyszer 60 µl folyadék kíséretében. Az összes állat kiválogatása után, a 2.5.2. *Panagrellus redivivus* tesztek c. fejezetben leírtakhoz hasonlóan 160

µl oldatot adtam minden lyukhoz, így elérve a végső 5 mg/l-es NAC koncentrációt.

### **2.3.2. Nano és nagyszemcsés cink-oxid közötti interakció tesztelése**

Az anyagok közötti interakciót vizsgáló kísérletek során is *P. redivivus* akut mortalitási tesztet végeztem. A 15 nm és a 140 nm ZnO 50-50%-os keverékéből alkottam meg a felhasznált koncentráció sorozatot. A kísérlet a 2.5.2. *Panagrellus redivivus* tesztek c. fejezetben leírt Milli-Q vizes kísérletek és a 2.3.1. *N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a Panagrellus redivivus-ra* c. fejezet szerint történt. Az előkísérletek során csak a három legmagasabb koncentrációban teszteltem (2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn) önmagában és NAC hozzáadásával a keveréket, hogy megnézzem van-e értékelhető eredmény. Miután kétszeri ismétlés során is erős eltérés mutatkozott a keverék és az önálló anyagok toxicitása között, főleg a NAC hozzáadásával, megismételtem az egész kísérletet a teljes koncentráció sorozatot felhasználva (0,63; 1,26; 2,51; 5,02 és 10,04 mg/l Zn). 24 óra termosztatós inkubáció után sztereomikroszkóp alatt vizsgáltam meg az állatok reakcióját a felhasznált anyagokra. Negatív kontrollként Milli-Q vizet használtam.

### **2.3.3. Sejten belüli reaktív oxigén gyök termelődés mérése**

A sejten belüli reaktív oxigéngyök termelődést aminofenil-fluoreszcein (APF, A36003, Thermo-Fischer, Németország) tesztel mértem a Szent István Egyetem Környezetbiztonsági Tanszékének munkatársa, Dr. Ács András segítségével. Az APF egy viszonylag új, az eddig használt festékekénél (mint pl.: a 2',7'-diklorodi-hidrofluoreszcein diacetát) specifikusabb és stabilabb indikátor a ROS méréshez. A fény által indukált oxidációt jobban tűri és leginkább hidroxil gyök (OH·), preoxinitrit anion (ONOO<sup>-</sup>) és hipoklorit anion (OCl<sup>-</sup>) jelenlétében válik fluoreszcensé (Nagano, 2009). Az APF háromszor erősebben reagál a hidroxil gyökre, mint egyéb ROS gyökökre pl.: szuperoxidra ( $\cdot O_2^-$ ), hidrogén-peroxidra (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a szingulett oxigénre (O<sup>1</sup><sub>2</sub>) (Setsukinai et al., 2003). Sok vizsgálat született arra vonatkozóan, hogy a nanofém-oxidok fotokatalitikus és antibakteriális tulajdonságai főképp a szabad és felülethez kötött hidroxil gyököknek köszönhetők, habár a szuperoxid és a hidrogén-peroxid is nagy szerepet játszik a folyamatok során. Így feltételezhetjük, hogy az OH· termelődése reprezentatív a totális ROS képződésre nano ZnO hatására.

Nincs szabvány módszer a sejten belüli ROS méréshez APF használatával, így egyéb mérési módszerek és protokollok fejlesztésével dolgoztam ki az általam használtat. A mérés beállítása a fonálféreg toxicitási

tesztekéhez hasonlóan történt, kivéve, hogy csak 3 órás expozíciónak voltak kitéve az állatok a három legmagasabb koncentrációban (2,51; 5,02 and 10,04 mg/l Zn), koncentrációnként 8 ismétlésben. A három legmagasabb koncentráció kiválasztása mögött az állt, hogy ezeknél már feltételezhetően mérhető mennyiségű ROS termelés történik. Az expozíciós időt előkísérletek alapján állítottam be, mivel 24 óra után ezekben a koncentrációkban már nagyarányú az elhullás, 3; 5 és 6 órás expozíciót vizsgáltam. Ezekből megmutatkozott, hogy nincs szignifikáns eltérés az időpontok között, így technikai szempontból a 3 órás expozíciót választottam. Emellett a 96 lyukú mikrotitráló lemez helyett 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztem az állatokat, hogy megfelelően kinyerhetőek legyenek az expozíciós idő leteltével. A három órás termosztatós inkubálás után ( $20 \pm 1$  °C) az egy kezeléshez tartozó ismétléseket egy Eppendorf csőbe csoportosítottam (40 állat/cső). A csövekben az állatokat 1,5 ml foszfátsó pufferrel (PBS, pH 7.2) átmostam. Ezt 5 percig tartó 600 g centrifugálás után (MiniSpin, Eppendorf A6 22331, Hamburg, Németország) az állatokkal együtt átpipettáztam egy számláló edénybe és onnan sztereomikroszkóp segítségével, 80  $\mu$ l folyadékkal együtt egy következő Eppendorf csőbe helyeztem át. A kísérlet előtt elkészített APF törzsoldatból (10  $\mu$ M PBS-ben) 160  $\mu$ l került mindegyik kezeléshez. Majd 2 perc homogenizálást követően (Qiagen TissueLyser LT homo, Hilden, Németország), újra centrifugába raktam őket (Qhaus Fe5718R, Németország). Itt 12 perc alatt 17 000 g-n megtörtént a lizátum és a pellet elválasztása egymástól. A felülúszóból kezelésként 2 párhuzamost készítve 75  $\mu$ l-t pipettáztam egy 96 lyukú fekete mikrotitráló lemez küvettáiba. Küvettánként 100  $\mu$ l-re egészítettem ki a mintákat PBS-t hozzáadva. A vakhoz (50  $\mu$ l PBS) és a pozitív kontrollhoz (50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM) 50  $\mu$ l-nyi APF törzsoldatot adtam hozzá. Annak ellenére, hogy az oldatban csak torna-peroxidáz (HRP) jelenlétében kellene reagálnia az APF-nek a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ra, molekuláris oxigén hatására a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bomlani kezd és így már az APF-el is reakcióba kerülhet. Mivel nincs szignifikáns eltérés a HRP által kiváltott és az oxigén hatására történő fluoreszcencia között, így megfelelően használható pozitív kontrollként. 30 perc inkubáció után (sötétben, 37 °C-on) 490 nm/515 nm hullámhosszon mikroplate olvasóban megmértük a kibocsájtott fluoreszcenciát (Thermo Scientific Varioskan Lux, Németország). Ugyancsak két párhuzamosban 30  $\mu$ l mintából Bradford reagens (Bradford Reagent Sigma, B6916-500 ml, Németország) segítségével fehérje mérés történt.

### **2.3.3.1. Módszerfejlesztés**

A protokollok alapján összerakott módszer nem volt működőképes. Irodalmi adatok alapján 5-20 kifejtett fonálféregből kell elvégezni a lizátum

készítését. Tapasztalataim alapján ez a mennyiség sem a fluoreszcencia mérésre, sem a fehérje mérésre nem volt elég, így 40-re emeltem a darabszámot. Emellett a protokoll az állatok mosásnál a felülúszó eltávolítását javasolja úgy, hogy az állatokkal együtt 100  $\mu$ l folyadék maradjon a csövekben. Ez nem kivitelezhető, hiszen nem lehet pontosan meghatározni az Eppendorf csőben maradó folyadék mennyiségét, hiába ülepednek le az állatok a cső aljára, ilyen kis mennyiségnél elkerülhetetlen, hogy a pipettába kerüljenek. Másik tanulmány ezzel szemben már kivitelezhetőbb módszert ajánl, az állatok üveg tárgylemezre való kipipettázásával, viszont az általuk javasolt 10  $\mu$ l-nyi folyadékmennyiség nagyon alacsony az én kísérleteimben használt 40 állathoz. Így saját tapasztalat alapján 80  $\mu$ l folyadék felhasználásával tudom az állatokat áthelyezni. Mindkét protokoll, továbbá egy másik tanulmány is a lizálás után javasolják az indikátor hozzáadását a mintához, tesztjeink során viszont azt tapasztaltuk, hogy túl sok idő telik el a tesztanyaggal történő inkubáció és a mérés között, így a még élő állatok képesek lehetnek lebontani a termelődött reaktív oxigén gyököket. Ezért én rögtön a teszt bontása után hozzáadtam az APF-et és azzal együtt végeztem el a lizálást, így megakadályozva a ROS-ok elbontását. A fejlesztések után használhatóvá vált a módszer, sikeres volt a minták fehérje és fluoreszcencia mérése. A kifejlesztett módszert 6 alkalommal ismételt meg, hogy megbizonyosodjak a működőképességéről.

## 3. EREDMÉNYEK

### 3.1. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

#### 3.1.1. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az átlagos méretet 100 részecske átmérőjének megméréseivel  $59 \pm 31$  és  $174 \pm 138$  (átlag  $\pm$  SD,  $n = 100$ ) nm-t számoltam, a névleges 15 és 140 nm átlag részecskeméretéhez képest. A részecskeeloszlásokból kiderült, hogy bár kis számban, de a 15 nm-es anyag is tartalmazott nem nano részecskéket és hogy a 140 nm ZnO-ban is bőven található 30-40 nm-es, de akár 640 nm-es részecskéket is. Viszont az oszlopszélességből kalkulálva, elmondhatjuk, hogy az első anyag több, mint 50%-ban nano-, míg a második több, mint 50 %-ban nagyszemcséket tartalmaz (kb. a részecskék 30%-ka esik a nanotartományba). A 15 nm-es szemcsénél a 34-51 nm-es, a 140 nm-es részecskénél pedig a 37-97 nm tartományba esnek a leggyakrabban előforduló részecskék. További felvételekből kiderült, hogy a nZnO részecskék hozzákötődtek a talajoldatban található szerves összetevőkhöz és a talajrészecskékkel nagyobb aggregátumokat képeztek, amelyek már nehezebben felvehetők a talajban élő organizmusok számára.

#### 3.1.2. Cink kioldódás mérés

A komplex Zn kioldódás mértékét Milli-Q vízben és talajoldatban végeztem el. Mindkét anyag esetében szignifikánsan jóval alacsonyabb az oldott cink mennyisége a talajoldatban, mint a Milli-Q vizes közegben. 24 óra elteltével mindkét anyagnál majdnem a fele, 48 óra elteltével a 15 nm ZnO esetében egy negyede, a 140 nm ZnO esetében két harmada lett talajoldatban az oldott cink mennyisége. A Milli-Q vizes közegben 24 órás expozíció után nem volt különbség a két anyag oldódásában, de 48 óra elmúltával a 15 nm ZnO oldódása a 140 nm-es anyag másfélszeresére növekedett. A talajoldatnál már 24 órát követően is szignifikánsan nagyobb mennyiségű oldódás történt a 15 nm ZnO esetében (35%-os növekedés), mint a nagyobb szemcseméretű ZnO-ból. Ezzel szemben 48 órát követően megfordult a trend és a nagyobb szemcseméret esetén tapasztaltam magasabb oldott cink mennyiséget. A 15 nm ZnO másfélszerese oldódott ki a nagyszemcsés anyagból. Talajoldatban a 48 órás mintánál a 140 nm ZnO oldódási intenzitása hasonló mértékben növekedett a Milli-Q víznél tapasztaltakkal a 24 órás mintához viszonyítva. 15 nm ZnO mintánál duplájára növekedett az oldott cink mennyisége Milli-Q víz közegben, ezzel szemben talajoldatban szignifikáns csökkenés történt a 24 órás és a 48 órás mintavétel között.

A pH érték az összes teszt anyagnál (15 nm, 140 nm ZnO és ZnCl<sub>2</sub>) 6-6,5 volt Milli-Q vizes közegben és 7-7,5 volt a talajoldat esetében.

### **3.1.3. *Panagrellus redivivus* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek**

Az akut mortalitási vizsgálat során Milli-Q vizes közegben minden tesztanyag nagyságrendekkel toxikusabb volt, mint talajoldatban. A LOAEC értékek 15 nm ZnO és 140 nm ZnO: 0,32 mg/l Zn és ZnCl<sub>2</sub> 1,26 mg/l Zn voltak. Talajoldatban nem volt semmilyen hatása a 15 nm és a 140 nm ZnO-nak a Milli-Q víz közegnél használt koncentráció sorozatban, csak a magasabb koncentrációkban és kizárólag a 48 órás expozíciós idő után (LOAEC: 15 nm ZnO és 140 nm ZnO: 1028,27 mg/l). A talajoldatban a ZnCl<sub>2</sub> toxikusabbnak bizonyult a másik két tesztanyagnál, a magasabb koncentrációsorban már 24 óra után az összes egyed elpusztult (LOAEC: 10,04 mg/l Zn). A talajoldatban emellett a két szemcseméret hatásai között is találtam szignifikáns különbséget, ezt az LC<sub>50</sub> értékek is alátámasztják (15 nm: 3645,3 mg/l Zn; 140 nm: 785,1 mg/l Zn). Itt a 140 nm-es nZnO bizonyult toxikusabbnak. Milli-Q vizes közegben nem tapasztaltam toxicitási különbséget az anyagok között.

### **3.1.4. *Folsomia candida* toxicitási tesztek: különböző tesztközegek és expozíciós útvonalak**

#### **3.1.4.1. Mortalitás vizsgálatok**

Az ugróvillás toxicitási tesztben a választott expozíciós útvonalak és tesztközegek (gipszen táplálékba és mesterséges talajközegbe kevert ZnO) szignifikánsan befolyásolták az állatok elhullását. A 15 nm ZnO és a ZnCl<sub>2</sub> használatakor mesterséges talajon szignifikánsan nagyobb volt a mortalitás, mint a táplálékba helyezett oldatok esetében. A mortalitási tesztnél egyik közegben sem tapasztaltam különbséget a szemcseméret toxicitása között. Viszont a ZnCl<sub>2</sub> a mesterséges talajban szignifikánsan magasabb mortalitást produkált a 15 nm és a 140 nm ZnO-nál. A legmagasabb koncentrációban (2571 mg/kg Zn) a ZnCl<sub>2</sub> kezelés során minden egyed elpusztult. Ezt az eredmény az LC<sub>50</sub> értékeket is alátámasztják (15 nm: 8228,2 mg/l Zn, 140 nm: 8170 mg/l Zn, ZnCl<sub>2</sub>: 557,31 mg/l Zn).

### **3.1.4.2. Reprodukció vizsgálatok**

A reprodukció tekintetében is hasonló tendenciát mutatott az expozíciós útvonalak hatása, ebben az esetben már minden anyag esetében erősebb toxicitást tapasztaltam a mesterséges talajban, mint a gipsz közegben táplálékba helyezve. Gipsz közegben a táplálékba helyezve a 15 nm és 140 nm ZnO szemcséknek enyhe és a ZnCl<sub>2</sub> tesztanyagnak erős szaporodás gátló hatása volt (LOAEC: 15 nm és 140 nm ZnO – 2571 mg/kg Zn; ZnCl<sub>2</sub> – 321,28 mg/kg Zn). Továbbá a 140 nm és a ZnCl<sub>2</sub> toxicitása között szignifikáns különbséget is tapasztaltam. A mesterséges talajban a reprodukció koncentrációfüggően csökkent. Az ugróvillás teszt során itt először mutatkozott meg szemcseméretfüggő toxikus hatás, a 140 nm ZnO-nak volt erősebb gátló hatása a reprodukcióra. A talajba keverve mindkét ZnO részecske enyhébb toxikus hatással bírt, mint a ZnCl<sub>2</sub>. Ezáltal mesterséges talajközegben reprodukciós teszt során a ZnCl<sub>2</sub> gátolta leginkább a reprodukciós folyamatokat. Ezek a hatások az EC<sub>50</sub> értékekben is megmutatkoznak (15 nm: 1543,9 mg/l Zn, 140 nm: 393,2 mg/l Zn, ZnCl<sub>2</sub>: 157,9mg/l Zn).

## **3.2. Hatásmechanizmusok megértése és vizsgálata**

### **3.2.1. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok**

Megvizsgáltam a 15 nm és a 140 nm szemcseméretű ZnO 50-50%-os keverékét önállóan és mindhárom anyagot (15 nm, 140 nm, keverék) az N-acetilcisztein hozzáadásával is. Az átlagos méret 100 részecske átmérőjének mérésével  $130 \pm 118$  nm (átlag  $\pm$  SD, n = 100) érték lett. Jól látszik, hogy a leggyakoribb részecskeméret a módusz alapján a 30 nm-es, viszont itt már nagyobb aggregátumok is jelen lehetnek (877 nm). Emellett a keveréknél jól megfigyelhető, hogy itt már mind a két alaktípus (gömb, irreguláris) is előfordul a mintákban. A NAC hozzáadása szignifikánsan nem változtatta meg az anyagok méretét vagy morfológiáját. Szemmel láthatóan nem képezett bevonatot az anyagok körül.

### **3.2.2. Cink kioldódás mérés**

A mitigációs vizsgálatokhoz kapcsolódó komplex Zn<sup>2+</sup> oldódás mérés során nem volt szignifikáns különbség az önmagában mért két különböző szemcseméretű ZnO között. Viszont mindkettőből szignifikánsan kevesebb cink ion oldódott ki (~30-40%-kal), mint a két anyag keverékéből. A cink kioldódás növekedése szintén tapasztalható volt a NAC hozzáadása során minden tesztanyagnál. Egyaránt erősen szignifikáns különbség volt a 15 nm és a 140 nm ZnO (20-30%), és kevésbé erős, de ugyancsak szignifikáns

különbség a keverék esetében (4%) összehasonlítva az anyagok kezeletlen párjainak kioldódási értékeivel. Továbbá minden esetben szignifikáns különbséget találtam a NAC-nel kezelt kísérleti anyagok között. A 15 nm és a keverék esetében ez a különbség viszonylag enyhe volt (~3%), ezzel szemben a 140 nm ZnO részecskéből mindkét másik anyaghoz képest jóval alacsonyabb mennyiségű oldott cinket mértem.

### **3.2.3. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *Panagrellus redivivus*-ra**

Az N-acetilcisztein mitigáló hatását vizsgáló akut mortalitási tesztek során hasonlóan a közegek hatását vizsgáló kísérletekhez, önmagukban nem tapasztaltam szemcseméret függő toxicitást. A kioldódott cink mennyiség alapján beállított koncentráció sorozatban a ZnCl<sub>2</sub> szignifikánsan kevésbé toxikusnak bizonyult, mint a két ZnO részecske. A NAC hozzáadása erősen szignifikánsan csökkentette a toxikus hatásokat a 15 nm ZnO esetében. A 140 nm ZnO esetében enyhébb mitigáló hatást tapasztaltam. A mitigáló hatás a 15 nm ZnO-nál a 2,51 mg/l, míg a 140 nm ZnO-nál már 1,26 mg/l koncentráció felett csökkenő tendenciát mutatott. Ezekkel szemben a ZnCl<sub>2</sub> felhasználásakor statisztikailag igazolható enyhe mitigációt csak a legnagyobb koncentráció (4,23 mg/l Zn) kizárása esetében tapasztaltam. A két különböző szemcseméretre is eltérően hatott a mitigációs kezelés. A két legmagasabb koncentrációt figyelmen kívül hagyva – ahol egyik anyagnál sem volt mitigáló hatás – a 15 nm ZnO jelenlétében erősebb toxicitás csökkenést tapasztaltam, mint a 140 nm ZnO esetében. Ezek az eredmények jól láthatóak az LC<sub>50</sub> értékekből is (Önállóan: 15 nm: 1,85 mg/l Zn; 2,66 mg/l Zn; NAC hozzáadásával: 15 nm: 14,091 mg/l Zn; 140 nm: 10,73 mg/l Zn).

### **3.2.4. Nano és nagyszemcsés cink-oxid közötti interakció tesztelése**

Szinergisztikus toxicitás növekedést tapasztaltam a két szemcseméretű ZnO 50-50%-os keverékének használatakor. A 15 nm ZnO részecskével összehasonlítva szignifikánsan toxikusabbnak bizonyult a keverék, már önállóan felhasználva is. Továbbá ez a toxicitásbeli különbség még inkább megnövekedett a NAC hozzáadásának következtében, ezáltal már nem csak a 15 nm, de a 140 nm ZnO részecskénél is erősebb lett a toxikus hatása a keveréknek. A keverékre nem volt statisztikailag igazolható mitigáló hatással az antioxidáns az összes koncentráció tekintetében, bár az 1,26 mg/l Zn-es koncentrációig enyhe toxicitás csökkenés volt észlelhető a NAC hozzáadása nélküli keverék hatásához viszonyítva. Ez a LOAEC értékekkel is alátámasztható (Tisztán: 0,31 mg/l; NAC hozzáadásával: 1,26 mg/l). A mitigáló hatás gyengébbnek bizonyult a keverék esetében, mint a



két ZnO szemcse önálló vizsgálatokor, ez látható az LC50 értékekből is (Önállóan: 0,65 mg/l Zn; NAC hozzáadásával: 1,62 mg/l Zn).

### **3.2.5. Sejten belüli reaktív oxigén gyök termelődés mérése**

A reaktív oxigén gyök (ROS) mérés során a leggyakrabban 0,59-0,63  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (kiugró érték: 1,07  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ) között volt az állatcsoportok mért ROS tartalma a Milli-Q vizes kontrollcsoportoknál, és 0,74-1,09  $\mu\text{M}/\text{mg}$  között a NAC-os kontrollcsoportoknál. Az adatsorok összehasonlíthatósága érdekében külön-külön átlagot vontam. Ezáltal a statisztikai vizsgálatok elvégzésénél már az átlagok alapján korrigált értékekkel dolgoztam (Milli Q vizes kontroll: 0,69  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ; NAC kontroll: 0,97  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). A három önállóan mért anyag közül a keverék esetében tapasztaltam a legmagasabb, a 140 nm ZnO esetében a legalacsonyabb ROS termelődést. Ebből kifolyólag a 140 nm ZnO a keveréktől és a 15 nm ZnO-tól is szignifikánsan különbözött. Koncentrációfüggő növekedést tapasztaltam a 15 nm ZnO és a keverék hatására termelődött ROS mennyiségben. A NAC hozzáadása kontrollcsoportok esetében magasabb mért oxigéngyök termelődés eredményezett. A NAC jelenlétében teljesen más tendenciát tapasztaltam, mint az önmagukban használt anyagoknál. Ebben az esetben szignifikáns különbség nem volt az anyagok között. Mind a 140 nm ZnO, mind pedig a keverék esetében a 2,51 mg/l Zn koncentrációban kiugró ROS növekedés és utána erős csökkenés tapasztalható. A 140 nm ZnO-nál önmagában és a NAC jelenlétében is a legmagasabb koncentrációban volt a legalacsonyabb mért ROS érték.

## 4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Kimutattam, hogy a különböző szemcseméretű ZnO részecskék (15 nm és 140 nm) kevésbé toxikusak a *Panagrellus redivivus* fonálféreg tesztfajra talajoldat közegben, mint Milli-Q vízben. Ez a ZnO szemcsék és a talaj szerves és szervetlen összetevői közötti kapcsolat miatt alakult így. Emellett bizonyítottam, hogy a *Folsomia candida* ugróvillás tesztfaj esetében a gipsz közegben történő csak orális expozíció csökkenti a 15 nm ZnO – a mortalitás esetében –, 15 és 140 nm ZnO – a reprodukció esetében – toxicitását a mesterséges talajhoz képest. A talajban az ugróvillások jobban ki vannak téve a kutikuláris expozíciónak is, emellett valószínűsíthető, hogy a gipszre kihelyezett szennyezett táplálékot képesek elkerülni.
- Mitigációs vizsgálatok során kiderítettem, hogy az N-acetilciszteinnek toxicitást csökkentő hatása van a *Panagrellus redivivus* tesztfajra 15 nm és 140 nm ZnO jelenlétében. Mindazonáltal kimutattam, hogy N-acetilciszteinnek nagyon alacsony a mitigáló hatása a ZnCl<sub>2</sub> és a két nanoanyag (15 nm és 140 nm nZnO) 50-50%-os keveréke használata esetén ugyanerre a tesztfajra.
- Sikeresen kimutatni az oldott Zn vizsgálat segítségével, hogy a Zn<sup>2+</sup> okozta toxikus hatásokon felül fennáll további szemcseméret specifikus hatás a vizsgált anyagoknál (15 nm és 140 nm ZnO). Ez a hatás az ionos toxicitástól független ROS képződés és a szemcsék közvetlen fizikai interakciója okán alakulhat ki.
- Bizonyítottam, hogy több esetben nem a kisebb szemcseméretű, hanem a 140 nm ZnO volt a toxikusabb (a talajoldat – *P. redivivus*; mesterséges talaj – *F. candida*; mitigációs vizsgálatok – *P. redivivus*). Ez betudható lehet a 15 nm ZnO részecskék gyorsabb és nagyobb mennyiségű kötődésének a talajszemcsékhez, morfológiai különbségeknek és annak, hogy az N-acetilcisztein kevésbé tudott komplexeket képezni ezzel az anyaggal, mint a kisebb szemcseméretűvel.
- Kimutattam, hogy a két anyag (15 nm és 140 nm ZnO) 50-50%-os keveréke szinergikusan toxikusabb, mint az anyagok önállóan alkalmazva.
- Kiegészítéseimmel létrehoztam egy, a *Panagrellus redivivus* tesztfajon használható, sejten belüli reaktív oxigéngyök (ROS) termelés mérésére

alkalmas módszert. A módszer segítségével kimutattam, hogy a ZnO részecskék minden esetben okoznak reaktív oxigén gyök termelődést a *Panagrellus redivivus* tesztfajnál és ez a mennyiség a legmagasabb a keverék és a legalacsonyabb a 140 nm ZnO esetében volt. Szakirodalomban a nZnO reaktív oxigén gyök termelődés indukáló hatását eddig még fonálféreg tesztorganizmuson nem vizsgálták.

## 5. DISZKUSSZIÓ

### 5.1. Tesztközegek hatásának vizsgálata különböző szemcseméretű ZnO jelenlétében

Ebben a tesztsorozatban két különböző tesztközeg hatását vizsgáltam a mikro- és a mezofauna egy-egy indikátor fajára. Tekintélyes különbséget találtam a toxicitásban mindkét faj esetében. A vizsgált ZnO tesztanyagok toxicitása csökkent a gipsz közeg (*Folsomia candida*) és a talajoldat (*Panagrellus redivivus*) használatakor. Ezek alapján is igazolható, hogy a tesztközeg szignifikánsan befolyásolja a toxicitási tesztek kimenetelét.

#### 5.1.1. *Panagrellus redivivus* toxicitási tesztek

Habár egyre több kísérlet foglalkozik a nZnO hatásaival környezetileg releváns talajállatokon, figyelembe véve több toxicitást befolyásoló tényezőt, mint az aggregáció, a felületi bevonat, a pH, az oldódás, az expozíció módja, a morfológia és a fotoindukált hatások, a tesztelési közeg hatásának kutatására kevesebb vizsgálat irányul.

A kísérleteimben az általam használt koncentrációkban minden tesztanyag toxikusnak bizonyult a *Panagrellus redivivus*-ra, annak ellenére, hogy irodalmi adatok alapján éppen ez a faj volt a legkevésbé érzékeny két másik baktérium fogyasztó fonálféreggel összehasonlítva. Speciálisan erre a fajra kevés akut toxicitási adatot találtam, más bakterivor fonálféreg faj, a *C. elegans* 24 órás LC<sub>50</sub> értékei víz közegben 0,32-111 mg/l Zn között mozognak. A Milli-Q vízben végzett kísérleteim az alacsonyabb értékek közé tartoznak. Talajoldatot kevés fonálféreggel végzett kísérletben alkalmaznak tesztközegként. Irodalmi adatok alapján alacsonyabb a cink felvétel a talajoldat jelenlétében, víz közeggel összevetve. A közegek hatását vizsgáló kísérleteink során a ZnO részecskék kevésbé voltak toxikusak a talajoldatban. Ez a részecskék/oldott cink és a talaj különböző komponensei, mint a fulvosav, a humin sav és a csersav között fellépő interakciók révén következhetett be. A három közül a csersav csökkentette a legerősebben a nanoszemcsés ZnO toxicitását. A kutatásomban a talajoldat mind a két szemcseméretű ZnO esetében erősen csökkentette a kioldódott ionok mennyiségét. Az oldódást befolyásolhatta a talajoldat pH értéke (Milli-Q vízbe: 6-6,5 pH, Talajoldat: 7-7,5 pH), mivel a neutrális pH-n a legkisebb a kioldódott ionok mennyisége az oldatban. Emellett a talajszemcsék felületén is megkötődhetnek a nanorészecskék, ami által csökkenhetett a biológiai elérhetőségük. Ezt támasztja alá az, hogy a Zn ionos formája nagyságrendekkel toxikusabb volt, mint a két ZnO forma talajoldat közegben. Míg a ZnO részecskék megkötődhettek a szemcséken, ahogy azt a

SEM vizsgálat is mutatta, addig a  $\text{ZnCl}_2$  szabadon felvehető maradt az állatok számára. A kísérleteim alapján a talajoldat közeg erősen csökkenti a tesztelt 15 nm és 140 nm ZnO toxikus hatásait *Panagrellus redivivus* fajra.

### **5.1.2. *Folsomia candida* toxicitási tesztek**

Irodalmi adatok alapján a nZnO-nak enyhén toxikus hatása van a *Folsomia candida* faj túlélésére (6400 mg/l Zn koncentrációban). A kutatók főként a kioldódott ionoknak tulajdonítják a toxikus hatásokat, megállapítják, hogy emiatt az oldott cinkformáknak erősebb hatása van, mint a nanorészecskéknak. Emellett a közeg pH-jának és szerves anyag tartalmának erős befolyása van a cink ionok oldódására és ezáltal a toxicitásra. Az irodalomban található elkerülési kísérletek is ezt támasztják alá, ahol a tesztelt ugróvillások kevésbé kerültek el a nanoszemcsés ZnO-ot, mint a  $\text{ZnCl}_2$ -ot. Ezeket az eredményeket a jelen kísérletek eredményei is megerősítik, habár a további kísérleteimből kiderül, hogy a nZnO toxicitását nem csak a  $\text{Zn}^{2+}$  oldódással lehet magyarázni. További publikált kísérletekben ugyanazt a módszert használták a különböző expozíciós útvonalak tesztelésére, mint amivel a kutatásaim alatt dolgoztam. A tesztelt anyagok között a nagyszemcsés cink is szerepelt, mellette kadmiummal, ólommal és rézzel is kísérleteztek. Az eredményeimmel egybehangzóan ők is azt tapasztalták, hogy a tesztelt fémek erősebb hatást fejtettek ki a *F. candida*-ra talajban, mint gipsz közegben táplálékba keverve. A talajban az ugróvillások jobban ki vannak téve a kutikuláris expozíciónak, emellett a gipsz közegen végzett vizsgálat során valószínűleg képesek elkerülni a kihelyezett szennyezett táplálékot. A mortalitási és reprodukciós eredmények alátámasztják, hogy a két expozíciós útvonal közül a gipsz közegen táplálékba helyezett 15 nm – a mortalitás esetében – , 15 és 140 nm ZnO – a reprodukció esetében – alacsonyabb a toxikus hatása a *Folsomia candida* fajra, mint a mesterséges talajba kevert anyagoknak.

### **5.2. N-acetilcisztein toxicitás mitigáló hatása a *Panagrellus redivivus*-ra**

Vizsgálataim során az N-acetilcisztein sikeresen csökkentette a két különböző szemcseméretű ZnO toxikus hatásait a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajra. A NAC mitigáló hatását nano-fémoxidokra főképp emberi sejtek tesztelésekor mutatták ki. Az erre vonatkozó vizsgálatok fő célja, hogy a rákkutatásban és egyéb emberi felhasználás során csökkentsék a ZnO nem kívánatos hatásait. Emellett születtek vizsgálatok vízibolha (*Daphnia magna*) érzékenysége is, a NAC itt is csökkentette a toxicitást. Fonálférgek esetében a ZnO és a NAC kombinációját eddig nem vizsgálták, viszont más

nanoanyag, pl.: az  $\text{Al}_2\text{O}_3$  és a  $\text{TiO}_2$  toxikus hatásait sikeresen mitigálták NAC segítségével.

Konkrétan az N-acetilciszteinek a Zn kioldódásra gyakorolt hatására vonatkozóan szakirodalmi forrásokat nem találtam, viszont az anyag kelátképző tulajdonságait több esetben is részletesen ismertették. Az általam mért oldódási értékek szignifikánsan magasabbak voltak a NAC hozzáadásakor. Ez annak tulajdonítható, hogy a teljes Zn tartalmat mértük, így a NAC által komplexben tartott Zn részecskék is bekerültek az értékbe. Míg a két tesztelt ZnO részecskéből önállóan nagyjából azonos mennyiségű Zn oldódott ki, addig a NAC hozzáadása után szignifikánsan alacsonyabb értéket kaptam a nagyobb szemcseméretnél. A 15 nm ZnO-ból nagyobb arányban tudott a NAC ionokat megkötni és azáltal csökkentette jobban a toxicitását is. Ez feltételezhetően annak köszönhető, hogy a két anyag eltérő felületi töltés sűrűséggel, eloszlással és elektromos potenciállal rendelkezett, a különböző méret és morfológia miatt. Így az N-acetilcisztein a hozzá képest nagyobb részben ellentétes töltéssel rendelkező részecskéekkel alkotott inkább komplexet. A toxicitási tesztjeimben a NAC-nel kezelt kontroll csoportokban mindig nagyobb volt az elhullás, mint a Milli-Q vizes kontrollcsoportoknál. Ez annak tudható be, hogy – főleg magasabb koncentrációkban – a NAC önmagában is marginálisan toxikus lehet. A kísérleteim rámutattak arra, hogy az N-acetilcisztein csökkenti a nZnO szemcsék toxicitását a *Panagrellus redivivus*-ra.

### **5.3. Reaktív oxigén gyök termelődés módszer értékelése**

A módszerfejlesztés során sikerült két publikált prokoll által leírt reaktív oxigéngyök mérést úgy módosítanom, hogy az általam használt teszt faj és indikátor anyag mellett használható és megismételhető módszer legyen. A tapasztalataim és fejlesztéseim nélkül a módszer nem volt használható. A fejlesztett módszert több alkalommal sikeresen alkalmaztam, így a jövőben fel tudom használni a sejten belül termelődött reaktív oxigéngyök mérésre APF indikátor használatával a *Panagrellus redivivus* tesztfajon.

### **5.4. Szemcseméretfüggő toxikus hatások és a háttérükben működő mechanizmusok értékelése**

A pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálat során kiderült, hogy a gyártó által megadott 15 és 140 nm-es részecskeméretnek valójában  $59 \pm 31$  és  $174 \pm 138$  nm méreteknak felelnek meg. Emellett mind a két anyagban találhatóak nano- és nagyszemcsék, bár a részecskék számának 50%-át nem haladják meg, így még a 15 nm a nano- és a 140 nm a nagyszemcsés tartományba tartozik. Ennek ellenére ezek a méretek valószínűsíthetően befolyással voltak a kísérleteim eredményeire. Feltételezhető, hogy ha a

nominális részecskeméret lett volna a valós, akkor az önálló vizsgálatok során (tesztközeg és mitigációs ágens befolyása nélkül) a kisebb szemcseméret lett volna a toxikusabb, a viszonylag azonos toxikus hatással szemben, amit jelen esetben tapasztaltam. Viszont abban az esetben sem kizárható, hogy a talajoldat, a talajközeg és az N-acetilcisztein használatakor a jelen vizsgálatokhoz képest eltérő eredményeket kapnék, tehát nem a 140 nm ZnO hatása lenne a toxikusabb. Emellett véleményem szerint a keveréknél még erősebb szinergikus toxicitás növekedést tapasztalnék, ha ténylegesen a megadott méretekkel dolgoztam volna.

#### **5.4.1. Közegek és expozíciós útvonalak vizsgálata során**

A nZnO-dal végzett kutatások során több esetben nem találtak különbséget a szemcseméreték toxikus hatása között, amíg más vizsgálatokban kimutatták, hogy a nanoszemcsés forma a toxikusabb. Az egyik okként a nanoszemcsés ZnO magasabb toxicitása mögött, a nagyszemcsés formához képest nagyobb mérvű oldódást neveztek meg. Ezzel ellentétben az általam használt 140 nm ZnO magasabb toxicitást mutatott a talajoldat (*P. redidivus*) és a mesterséges talaj (*F. candida*) jelenlétében, mint a kisebb szemcseméretű párja. Valószínűsíthetjük, hogy a 15 nm ZnO erősebben és gyorsabban aggregálódott a talajszemcsék jelenlétében és ezáltal csökkenhetett a toxikus hatása. Ezt a hipotézist a kioldódott ionok vizsgálata is alátámasztja, mivel kevesebb cink ion volt található a 15 nm ZnO mintában, mint a nagyobb szemcsésben 48 órás inkubációt követően. Ugyanakkor a Milli-Q vizes közegben a 15 nm ZnO oldódása közel kétszerese volt a nagyobb szemcsésnek. Emellett a két anyag morfológiája is különbözött (15 nm ZnO gömb, 140 nm ZnO irreguláris), ami szintén okozhatta a toxicitásbeli különbséget. A vizsgálataim alapján az általam használt nagyobb szemcseméretű (140 nm) ZnO magasabb toxicitást gyakorolt a talajoldat közegben a *Panagrellus redidivus* és mesterséges talaj közegben a *Folsomia candida* fajra, mint a kisebb szemcseméretű ZnO (15 nm).

#### **5.4.2. Reaktív oxigéngyök termelődés mennyiségének vizsgálata során**

Nanoszemcsés ZnO vizsgálatokkor általában kimutatható a reaktív oxigéngyökök koncentrációtól függő termelődése. Más fém-oxidokkal összehasonlítva a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődés közegfüggő, viszont a szuperoxid termelődés minden esetben a legmagasabb volt a nZnO-nál. Az irodalomban nano- és nagyszemcsés ZnO összehasonlítása során a legtöbb esetben tisztán látható szemcseméretfüggő hatást tapasztaltak, a kisebb szemcseméretű anyag esetében volt magasabb a termelődött mennyiség. A vizsgálataim során a legnagyobb termelődött mennyiség 3 órás expozíciót követően a

keverékben volt, a legkisebb pedig a 140 nm ZnO-ban. A NAC hozzáadásakor a reaktív oxigényökök jóval nagyobb mértékben termelődtek, mint önállóan a Milli-Q vizes kontrollcsoporthoz képest. A szakirodalomban általában a ROS termelődés csökkenését tapasztalják NAC hatására. Feltételezhető, hogy a NAC által indukált GSH termelődés az általunk alkalmazott 3 órás ROS mérési expozíció alatt még nem indult be, így nem csökkenést tapasztaltam a ROS értékekben, hanem növekedést.

### **5.4.3. N-acetilcisztein alkalmazása során**

A szemcseméretfüggő mitigációra kevés adatot sikerült találnom, mivel az ilyen jellegű vizsgálatoknál a legtöbb esetben kimaradt a nagyszemcsés kontroll. Egy ilyen témával foglalkozó kutatásban bár nano mérettartományba tartozó, de két különböző méretű ZnO részecske hatását hasonlították össze (18,5±1,2 nm és 47,1±5,1 nm ZnO) az emberi neuroblasztóma SHSY5Y sejt vonalra. Önállóan a kisebb szemcseméret volt a toxikusabb, a NAC hozzáadása mindkét szemcseméret toxicitását csökkentette. A mitigáció a 40 mg/l alatti koncentrációkban volt a legerősebb, e felett már csökkent hatást észleltek és a két szemcseméret toxicitás csökkenésében enyhe különbséget tapasztaltak. A nagyobb szemcseméret esetén volt kisebb a mitigáció mértéke, hasonlóan az általam végzett vizsgálatokhoz, ahol a 140 nm ZnO-nál tapasztaltam ezt az enyhébb hatást. Emellett, hasonlóan a jelen dolgozat kísérleteihez, a tanulmányban a nanoszemcsés ZnO anyagok hatásait egy ionos formában lévő Zn-kel a ZnCl<sub>2</sub>-dal is összehasonlították. Habár ebben az esetben megfigyeltek mitigációt két alacsonyabb koncentrációban (122,9 μM és 245,7 μM ZnCl<sub>2</sub>), de e felett a sejt túlélési aránya 10% alá csökkent még a NAC hozzáadása mellett is. Tehát jóval gyengébben hatott a NAC a ZnCl<sub>2</sub>-ra, mint a nanoformákra, hasonlóan az én eredményeimhez. Ezen felül az általam használt ZnCl<sub>2</sub> koncentrációk a tesztrendszerben jelenlévő kioldódott Zn ion mennyiséget reprezentálták, így az anyagoknál önmagukban és NAC hozzáadásával is jól látható, hogy a két szemcseméretű ZnO toxikus hatásainak hátterében nem csak az ionok és az ionok hatására termelődött ROS állnak, hanem további szemcseméret függő toxikus hatások is lehetnek. Ezek az eredmények korrelálnak más kutatásokkal, ahol kimutatták, hogy a kioldódott Zn<sup>2+</sup> és a generált ROS mennyiség nem indukálhatott olyan mértékű toxicitást, mint amit tapasztaltak. Így feltételezéseik szerint is további toxicitási tényezőknek is fent kell állniuk az észlelt hatások eléréséhez. A kísérleteim alapján a NAC kevésbé hat az ionos toxicitásra. Emellett az általam használt két anyagra eltérő toxicitási mechanizmus jellemező, így itt a nagyobb szemcseméretű forma bizonyult toxikusabbnak.



#### 5.4.4. Két anyag közötti interakció vizsgálata során

Két különböző nanoanyag keverésekor kimutattak mások is szinergisztikus toxicitás növekedést pl.  $n\text{ZnO}+n\text{Ag}$ ;  $n\text{Au}+n\text{Pt}$  és  $n\text{Ag}+n\text{TiO}_2$ . Egyes esetekben ezzel szemben a negatív hatások csökkenését tapasztalták. Az irodalomban a nanoszemcsés ZnO és  $\text{TiO}_2$  keverésekor toxicitás csökkenés lépett fel, ezt a hatást a  $\text{TiO}_2$  felületén adszorbeálódott és ezáltal kevésbé felvehető  $\text{Zn}^{2+}$  csökkenésével magyarázták. A vizsgálataimban a két különböző szemcseméretű ZnO 50-50%-os keveréknél erős toxicitás növekedést tapasztaltam. A SEM képek alátámasztják, hogy mindkét anyag megtalálható az új keverékben, így egy új, a két másik anyag közötti átlag szemcsemérettel rendelkező ZnO-t sikerült létrehozni ( $130 \pm 118$  nm), amiben mind gömb, mind irreguláris alakú részecskék is jelen vannak. A keverék esetében mindkét anyagnál erősen szignifikánsan magasabb volt a Zn kioldódás és marginálisan a ROS termelődés is. A toxicitás növekedése fennállt az N-acetilcisztein hozzáadása mellett is, a keveréknél volt a legalacsonyabb mitigáló hatása a NAC-nak. A NAC vizsgálatok alapján az antioxidáns kevésbé befolyásolja a kioldódott ionok által okozott toxikus hatásokat. A keverékben másfélszer magasabb volt ezeknek a mennyisége, mint a két anyagnál külön-külön. Emellett az N-acetilcisztein ebből az anyagból tudott a legkevesebbet megkötni (Keverék  $< 140$  nm  $< 15$  nm). A részecskeeloszlásokból is látható, hogy ~30%-ban a 140 nm ZnO-ban is találhatunk nano részecskéket (37-97 nm, ebből leggyakrabban a 37 nm fordul elő), így a kétféle anyag összekeverése okán megnőtt a 30 nm-es részecskék aránya a keverékben. Emellett feltételezhetően a nagyobb részecskék diszpergáló hatást fejtettek ki a tesztrendszerre. A keverékben a részecskék inkább egymással aggregálódtak az eltérő töltés eloszlás miatt, mint a saját méretcsoportjukhoz tartozó részecskékkel. Ebből kifolyólag a 140 nm ZnO részecskék felületén aggregálódtak kisebb részecskék által fixálódott a nagy felület, nőtt a kioldódás, a reakcióképesség, ezáltal a toxicitás. Tehát a szemcsék összekeverésével a két anyag különböző negatív hatásai (15 nm - részecskeméretből adódó, 140 nm - irreguláris morfológia) felerősítették egymást és ez állhat az erős toxikus hatások hátterében.

#### 5.5. Következtetések összegzése

Általánosságban elmondható, hogy mindhárom talajélőlény csoport érzékenyen reagált a 15 és a 140 nm-es ZnO kezelésre. A legérzékenyebbnek a mikrofaunába tartozó *Panagrellus redivivus* faj bizonyult Milli-Q vizes közegben. A vizsgálatokból kiderült, hogy a különböző közegek (Milli-Q víz, talajoldat), a tesztalajok fizikai és biológiai jellemzői és expozíciós útvonalak (orális, dermális és orális) is befolyásolják a tesztanyagok toxikus

hatását. Emellett az N-acetilcisztein képes mitigálni mindkét vizsgált szemcseméret toxikus hatását.

Az általam átalakított módszerrel minden felhasznált anyagnál reaktív oxigéngyök termelődést tapasztaltam. Önállóan legmagasabbat a keverék esetében, legalacsonyabbat a 140 nm ZnO-nál. NAC hozzáadásával az anyag kismértékű toxicitásának következtében minden érték magasabb lett, mint önállóan. A vizsgálat elvégzéséhez magasabb expozíciós idő szükséges, hogy az antioxidáns ki tudja fejteni a hatását.

Az általam használt két szemcseméret közül több esetben is a 140 nm ZnO bizonyult toxikusabbnak (a talajoldat – *P. redidivus*; mesterséges talaj – *F. candida*; mitigációs vizsgálatok – *P. redidivus*). Ez indokolható a 15 nm ZnO részecskék gyorsabb és nagyobb mennyiségű kötődésével a talajszemcsékhez, morfológiai különbségekkel, töltés eloszlás különbséggel és azzal, hogy az N-acetilcisztein kevésbé tudott komplexeket képezni ezzel az anyaggal, mint a kisebb szemcseméretűvel. Valószínűleg ennek a háttérében is a morfológiai különbségek állnak.

Emellett a NAC hatása kevésbé befolyásolta a cink ionok toxikus hatását, ezért is lehetett, hogy a két anyag keveréke esetében, ahol szignifikánsan magasabb volt az oldódás, nem tapasztaltam statisztikailag igazolható mitigáló hatást.

Az általam használt ZnCl<sub>2</sub> koncentrációk a tesztrendszerben jelenlévő kioldódott Zn ion mennyiséget reprezentálták, ezáltal kimutatható, hogy a két szemcseméretű ZnO toxikus hatásai háttérében nem csak az ionok és az ionok hatására termelődött ROS állnak, hanem egyéb szemcseméret függő toxikus hatások is lehetnek, hasonlóan ezt alátámasztó irodalmi adatokhoz.

A két anyag 50-50%-os keverésekor a toxikus hatások jelentős mértékben megnöttek, magasabb lett az oldott cink tartalom és a termelődött ROS mennyiség is. Feltételezhető, hogy az anyagok kémiai és fizikai tulajdonságai (több kisebb szemcse – magasabb biológiai elérhetőség, fixált nagy felületből, morfológiai szempontokból adódó toxicitás növekedés) egymás hatásait felerősítve egy sokkal reaktívabb és a *P. redidivus* számára könnyebben felvehető elegyet képeztek.

A vizsgálatok alapján a 15 nm ZnO önmagában nagyobb mennyiségű ROS termelésére képes és a kioldódott ionok mennyisége is magasabb, mint a 140 nm ZnO esetében. Viszont, ha már egy további, a 15 nm ZnO toxikus hatásait semlegesítő tesztelemet is a rendszerbe helyezünk (pl. talaj, talajoldat tesztközeg, mitigáló ágens), rögtön a 140 nm ZnO lesz a toxikusabb. Ebből arra lehet következtetni, hogy ennél az anyagnál egy harmadik tényező is fennáll, amit kevésbé befolyásolnak a talajszemcsék és az N-acetilcisztein is. Feltételezhetően ez az anyag irreguláris részecske morfológiájából adódik.

## 6. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

### 6.1. Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

- Kiss L. V.**, Hrács K., Nagy P. I., Seres A., (2015): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg testszervezetekre. *Állattani Közlemények*. 100:(1-2) 77-88.
- Kiss L. V.**, Hrács K., Nagy P.I., Seres A. (2016): Nano szemcseméretű fém-oxidok hatásának értékelése a talajban élő kiemelt ökológiai jelentőségű mikroorganizmusokra. *Agrokémia és Talajtan* 65: (1) 115–134.
- Kiss, L. V.**, Hrács, K., Nagy, P. I., Seres, A. (2018): Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on *Panagrellus redivivus* (Nematoda) and *Folsomia candida* (Collembola) in Various Test Media. *International Journal of Environmental Research*. 12(2):233. (IF:1,48)
- Hrács, K., Sávoly, Z., Seres, A., **Kiss, L.V.**, Papp, I.Z., Kukovecz, K., Záray, Gy., Nagy, P.I. (2018): Toxicity and uptake of nanoparticulate and bulk ZnO in nematodes with different life strategies. *Ecotoxicology*. 1-11. (IF:2,49)
- Kiss, L. V.**; Boros G.; Seres, A.; Nagy, P. I.(2020): Nano szemcseméretű fém-oxidok kulcsfontosságú talajállat csoportokra gyakorolt hatásainak áttekintése. *Állattani Közlemények*. 105(1-2): 29-57.

#### **Tudományos ismeretterjesztő publikációk:**

- Kiss, L. V.**, Nagy, P.I., Seres, A. (2017): Nanoanyagok a talajéletben: Félelmetes parányok. *TermészetBúvár* 72: (2) 10-12.
- Kiss, L.V.** (2017): A nanoanyagok környezeti hatásai: Veszélyek és Lehetőségek. *Élet és Tudomány LXXII.*: (12) 361-363.

### 6.2. Szóbeli előadások az értekezés témájában

- Kiss L. V.**, Hrács K., Seres A., Nagy P.I. (2015): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg testszervezetekre. Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztály, 2015. március 4.
- Nagy P., Hrács K., Seres., Sávoly Z., **Kiss L. V.**, Bakonyi G.: Nanoanyagok hatásvizsgálata talajállatokon. Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztály, 2015. október 7.

- Seres A., Hrác K., **Kiss L. V.**, Posta K., Nagy P.I. (2015): Nano-és nagyszemcsés cink-oxid hatásainak vizsgálata talajlakó szervezeteken. a Magyar Toxikológusok Társasága 2015. évi konferenciája, Harkány, 2015.10.14-16.
- Kiss L. V.** (2016): Mi a manó az a nano? II. Élettudományi Liftbeszéd Fesztivál, Eötvös Lóránt Tudományegyetem, Budapest, 2016. 03.05. A legjobb analógia témában: Különdíj
- Kiss L. V.**, Hrác K., Nagy P.I., Seres A. (2016): Többféle szemcseméretű cink-oxid és réz toxikus hatásainak vizsgálata szabadonélő fonálféreg tesztszervezeten. In: Fenesi A, László Z, Markó B (szerk.)17. Kolozsvári Biológus Napok. 98 p. Konferencia helye, ideje: Kolozsvár, Románia, 2016.04.08-2016.04.09. Kolozsvár: Babes-Bolyai Tudományegyetem, p. 44.
- Kiss, L.V.** ; Seres, A. ; Nagy, P.I. (2018): Nano cink-oxid toxicitása stimulált UV sugárzás alatt és az N-acetilcisztein toxicitás csökkentő hatása a *Panagrellus redivivus* fonálféreg fajra. In: TOX'2018 Tudományos Konferencia Program, kivonatok (2018) pp. 52-52. Paper: C1-2 , 1 p.
- Kiss, L. V.** (2019): Az UV fény és mitigációs eljárások hatása a különböző szemcseméretű ZnO toxicitására. ÚNKP Konferencia.

### 6.3. Poszterek az értekezés témájában

- Kiss L. V.**, Hrác K., Nagy P.I., Seres A.(2015): Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztszervezetekre. V. Ökotoxikológiai Konferencia: előadás és poszter kötete. 46 p. Budapest, 2015.11.20.
- Kiss L. V.**, Hrác K., Nagy P.I., Seres A. (2016): The toxic effects of different particle sized zinc oxide on terrestrial springtail and nematode test organisms. XVII International Colloquium on Soil Zoology, Nara, 2016. 08. 22-26.
- Kiss L. V.**, Nagy P.I., Seres A. (2018): Photo-induced toxicity of zinc oxide nanoparticles and toxicity mitigation by N-acetylcysteine on a soil-living nematode: *Panagrellus redivivus*. 14th Central European Workshop on Soil Zoology, České Budějovice, Czech Republic, 2018.04.16-18.
- Kiss L. V.**, Hyodo F., Nagy P.I., Seres A. (2018): Differently sized zinc oxide nanoparticles effects on microbial biomass. SETAC Europe 28th Annual Meeting, Róma, Olaszország. 2018.05.13-17.
- Kiss L. V.**, Sávoly Z., Seres A., Nagy P.I. (2019): Differently sized zinc oxide particles toxicity mitigation by N-acetylcysteine and mixed

toxicity on a soil-living nematode: *Panagrellus redivivus*. SETAC Europe 29th Annual Meeting, Helsinki, Finnország. 2019.05.26-30.