DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Gubó Eduard

MOSONMAGYARÓVÁR

2022

SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
ALBERT KÁZMÉR MOSONMAGYARÓVÁRI KAR
VÍZGAZDÁLKODÁSI ÉS TERMÉSZETI ÖKOSZISZTÉMÁK TANSZÉK

WITTMANN ANTAL NÖVÉNY-, ÁLLAT- ÉS ÉLELMISZER-TUDOMÁNYI MULTIDISZCIPLINÁRIS DOKTORI ISKOLA
HABERLANDT GOTTLIEB NÖVÉNYTUDOMÁNYI DOKTORI PROGRAM

DOKTORI ISKOLA VEZETŐ:
Prof. Dr. Varga László DSc
egyetemi tanár

PROGRAMVEZETŐ:
Prof. Dr. Pinke Gyula DSc
egyetemi tanár

KONZULENSEK:
Prof. Dr. Szakál Pál
professor emeritus
Dr. Plutzer Judit
hidrobiológus PhD

Ösztrogénhatású anyagok felhalmozódásának vizsgálata tejelő szarvasmarha hígtrágyával kezelt talajokon és ezeken a területeken termesztett kukorica *(Zea mays* L.*)* és olaszperje *(Lolium multiflorum* L.*)* különböző fenofázisaiban

KÉSZÍTETTE:

Gubó Eduard

PhD hallgató

Mosonmagyaróvár

2022

Ösztrogénhatású anyagok felhalmozódásának vizsgálata tejelő szarvasmarha hígtrágyával kezelt talajokon és ezeken a területeken termesztett kukorica *(Zea mays* L.*)* és olaszperje *(Lolium multiflorum* L.*)* különböző fenofázisaban

Írta:

Gubó Eduard

Készült a Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola, Haberlandt Gottlieb Növénytudományi Doktori Programja keretében

Témavezetők: **Prof. Dr. Szakál Pál** **……..**

Dr. Plutzer Judit **……..**

Elfogadásra javaslom (igen / nem) (aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton……%-ot ért el,

Mosonmagyaróvár, …… ..……..

a Szigorlati Bizottság Elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr. ……) igen/nem ….……..

Második bíráló (Dr. ……) igen/nem …….

Esetleg harmadik bíráló (Dr. ……) igen/nem …….

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján ……%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár, …… (A Bírálóbizottság elnöke)

Doktori (PhD) oklevél minősítése…… (Az EDT elnöke)

Tartalom

Kivonat 8
Abstract 11
1. Bevezetés 14
2. Irodalmi áttekintés 16
2.1. A talaj, talajszennyezés 16
2.2. A hígtrágya 17
2.2.1. Az istállótrágya és hígtrágya hatásai a talajra 18
2.3. Az endokrin rendszer, és azokat károsító vegyületek 19
2.3.1. Ösztrogének 21
2.3.2. Fitoösztrogének 22
2.3.3. Növényvédőszerek (peszticidek) 23
2.3.4. Ftalátok 25
2.3.5. Biszfenol-A 27
2.3.6. Alkilfenolok 28
2.4. Ösztrogének a környezetünkben 29
2.4.1. Ösztrogének a talajban 32
2.4.2. A növények ösztrogén felvétele 34
2.5. Az ösztrogének hatása a gerinctelenekre 36
2.6. Az ösztrogének hatása a gerincesekre 37
2.6.1. Halakra gyakorolt hatás 37
2.6.2. Madarakra gyakorolt hatás 38
2.6.3. Emlősökre gyakorolt hatás 39
2.7. Az ösztrogénhatású vegyületek szabályozása 43
2.7.1. Az ösztrogénhatású vegyületek kitettségének minimalizálása . 45
2.8. Az ösztrogénhatású vegyületeket kimutató módszerek 47
2.9. A kutatásunk célja és hipotézisei 51
3. Anyag és módszer 52

3.1. A vizsgált telep bemutatása 52
3.2. Mintavételi eljárások és a minták előkészítése 55
3.3. *In vitro* élesztőteszt 61
3.3.1. Yeast Estrogen Screen (YES), élesztőteszt elve 62
3.3.2. Lemez beállítása 63
3.3.3. Az élesztőteszt kiértékelés 65
3.3.4. Az élesztőteszt módszerfejlesztése és validálása hígtrágya, talaj és növényminták vizsgálatához 67
3.4. *In vivo* Zebradánió teszt 71
3.4.1. Mintaelőkészítés mikroinjektáláshoz 71
3.4.2. A Tg (vtg1: mCherry) biomarker zebrahal vonal jellemzése 71
3.4.3. Zebradánió szaporítás és petegyűjtés 72
3.4.4. Mikroinjektálás 72
3.4.5. Szemrevételezés, elemzés 73
3.4.6. Mikroinjektálási módszer optimalizálása 74
3.5. Analitikai tesztek (UHPLC-FLD) 78
3.5.1. Mintaelőkészítés 78
3.5.2. Az analitikai módszer leírása 78
3.5.3. Vegyszerek 79
3.6. Toxikológiai tesztek 79
3.6.1. *Azotobacter agile* és *Pseudomonas fluoreszcens* talaj toxicitási tesztek 82
3.6.2. *Daphnia* akut immobilizációs teszt 83
3.6.3. Alga növekedésgátlási teszt 83
3.6.4. Fitotoxicitási teszt 84
3.7. Statisztikai módszerek ismertetése 85
4. Eredmények, értékelésük és következtetések 87
4.1. *In vitro* élesztőteszt eredményei 88
4.1.1. Hígtrágya ösztrogénhatás-vizsgálatának eredményei 88

4.1.2. Gyógyszerhatóanyagok ösztrogénhatás-vizsgálatának eredményei 89
4.1.2.1. Kloprosztenol hatóanyag ösztrogénhatása 91
4.1.2.2. D-Phe6-gonadorelin hatóanyag ösztrogénhatása 91
4.1.2.3. Dinoproszt-trometamin hatóanyag ösztrogénhatása 91
4.1.2.4. A szaporodásbiológiai elemzés eredményei 91
4.1.2.5. Statisztikai értékelés 93
4.1.2.6. Következtetések a hígtrágya és gyógyszerhatóanyagok vizsgálatához 97
4.1.3. Az olaszperje (*Lolium multiflorum* L.) termesztése és vizsgálata 102
4.1.3.1 Az olaszperje talajmintáinak eredményei 103
4.1.3.2 Az olaszperje gyökerének eredményei 105
4.1.3.3 Az olaszperje hajtásának eredményei 106
4.1.3.4. Statisztikai kiértékelés az olaszperje eredményeihez 109
4.1.4 A kukorica (*Zea mays* L.) termesztése és vizsgálata 113
4.1.4.1. A kukorica talajmintáinak eredményei 114
4.1.4.2. A kukorica gyökerének eredményei 116
4.1.4.3. A kukorica hajtás és szemtermés eredményei 117
4.1.4.4. Statisztikai értékelés 120
4.1.5 Következtetések az élesztőteszt eredményeihez 124
4.2 *In vivo* Zebradánió teszt eredményei 125
4.2.1. A mikroinjektáláson alapuló halembriótesztek eredményei 125
4.2.2. Következtetés a zebradánió tesztekhez 130
4.3. Analitikai tesztek eredményei 131
4.3.1. A hígtrágyaminták analitikai eredményei 131
4.3.2. Az olaszperje analitikai eredményei 132
4.3.2.1. Talajminták eredményei 132
4.3.2.2. Gyökérminták eredményei 133

4.3.2.3. Hajtásminták eredményei 133
4.3.2.4. Fűszenázs eredményei 134
4.3.3. A kukorica analitikai eredményei 134
4.3.3.1. Talajminták eredményei 134
4.3.3.2. Gyökérminták eredményei 135
4.3.3.3. Hajtásminták eredményei 135
4.3.3.4. Termés (szemtermés és kukoricaszilázs) 136
4.3.4. Következtetések az analitikai mérésekhez 136
4.4. Toxikológiai tesztek eredményei 137
4.4.1. Toxikológiai eredmények kezeletlen hígtrágyával (szeparátor használata nélkül) 137
4.4.2. Toxikológiai eredmények kezelt hígtrágyával (szeparátor használata után) 139
4.4.3. Statisztikai értékelés 142
4.4.4. Következtetések a toxikológiai vizsgálatokhoz 142
5. Általános következtetések, javaslatok 146
6. Összefoglalás 149
7. Új tudományos eredmények 153
8. Mellékletek 155
9. Irodalomjegyzék 170
Köszönetnyilvánítás 203

Rövidítések jegyzéke

17α-E2	17α-estradiol (17α-ösztradiol)
17β-E2	17β-estradiol (17β-ösztradiol)
17α-EE2	17α-ethynylestradiol (etinil-ösztradiol)
APEO	Alkylphenol ethoxylates (4-alkil-fenoletoxilat)
BPA	Bisphenol A (biszfenol-A)
BPAF	Bisphenol AF (4,4-hexafluorizopropilidén difenol)
BPF	Bisphenol F (4,4-metilén-difenol)
BPS	Bisphenol S (4-hidroxil-fenil-szulfon)
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane (diklór-difenil-triklóretán)
DES	Diethylstilbestrol (dietilsztilbösztrol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)
E1	Estrone (ösztron)
E3	Estriol (ösztriol)
EDC	Endocrine Disrupting Compounds (hormonhatást megzavaró vegyület)
ER	Estrogen Receptot (ösztrogén receptor)
ERE	Estrogen Receptor Element (ösztrogén receptor kötőhely)
EEQ	estradiolequivalent (ösztradiol ekvivalens)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat)
FLD	Fluorescence detector (fluoreszcens detektor)

GC	Gas Chromatography (gázkromatográfia)
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (gonadotropinfelszabadító hormon)
hERα	Human estrogen receptor-α (humán ösztrogén receptor α)
hERβ	Human estrogen receptor- β (humán ösztrogén receptor β)
hpf	Hours post-fertilization (termékenyítés után eltelt órák száma)
ID	integrated density (integrált sűrűség)
IMPOSEX	superIMPOsition of SEXual characteristics
LC	Liquid Chromatography (folyadékkromatográfia)
LH	Luteinizing hormone (luteinizáló hormon)
LID	Lowest Ineffective dilutions (legalacsonyabb hatástalan hígítás)
LOD	Limit of Detection (kimutatási határ)
LOQ	Limit of Quantitation (meghatározási határ)
MCF-7	Human Breast Cancer Cell Line (humán mellrákból származó sejtvonal)
MS	Mass Spectrometry (tömegspektrometria)
PAE	Phthalates (ftalátok)
PCA	Principal Component Analysis (főkomponens-elemzés)
PCB	Polychlorinated biphenyls (poliklórozott bifenilek)
PCDF	polychlorinated dibenzofurans (poliklórozott dibenzofuránok)
PDA	Photodiode array (diódasoros detektor)

PGF2α	Prostaglandin F2 alpha (prosztaglandin)
POP	Persistent organic pollutants (perzisztens organikus pollutánsok)
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (peroxiszóma-proliferátor-aktivált receptor)
PVC	Poly (vinyl chloride) (polivinil-klorid)
SE	Steroid Estrogen (szteroid ösztrogén)
SPE	Solid Phase Extraction (szilárd fázisú extrakció)
TBT	Tributyltin (tributil-ón)
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography (ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia)
VTG	Vitellogenin (vitellogenin)
YES	Yeast Estrogen screen (élesztőteszt)

Kivonat

A környezetünkben megjelenő ösztrogénhatású vegyületek számos forrásból származhatnak. Az egyik legnagyobb szennyezőforrást az intenzív állattartási technológiák jelentik. Kutatásunk során egy Pest megyei intenzív szarvasmarhatartó telep ösztrogén lábnyomát próbáltuk végigkövetni. Az intenzív tejelő telepen 2017 és 2020 között meghatároztuk a keletkező hígtrágya ösztrogénhatását negyedéves ciklusokban, majd a telepen alkalmazott 5 ivarzásindukáló gyógyszer (Alfaglandin, PGF, Dinolytic, Gonavet, Ovarelin) és ezen belül 3 hatóanyag (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) sorsát követtük nyomon a felhasználástól egészen a hígtrágyában való megjelenésükig.

Az ösztrogénhatás-vizsgálatokhoz a humán ösztrogénreceptort tartalmazó élesztőtesztet (*Saccharomyces cerevisiae* BJ3505) alkalmaztuk az ISO 19040-1:2018 szabvány alapján. A YES (Yeast Estrogen Screen) teszt bizonyult a doktori munka fő vizsgálati módszerének, melyhez sok esetben analitikai mérés (UHPLC-FLD) is csatlakozott. Emellett a minták egy részével kiegészítő toxikológiai vizsgálatokat végeztünk: transzgénikus zebradánió (*Brachydanio rerio* Tg(vtg mCherry) fluoreszcenciateszt vitellogenin kimutatására, *Daphnia magna* 48-órás akut immobilizációs teszt, alga növekedésgátlási teszt (*Pseudokirchneriella subcapitata*), talajbaktérium-teszt *Azotobacter agile, Pseudomonas fluorescens* és vetőmag-csíráztatási teszt (ISO 18763) fitotoxicitás vizsgálatára öt növényfaj (cirok, tritikálé, fehér mustár, kerti zsázsa, hajdina) esetében. Kisparcellás kísérletekben vizsgáltuk két szántóföldi növény (olaszperje, silókukorica) ösztrogénanyag-akkumulációját (E1, 17β-E2, 17α-E2, 17α-EE2, E3) istállótrágyával,

illetve hígtrágyával kezelt területen, a fejlődésük több fenofázisában. Mintavétel történt a talajból, a növények gyökeréből, hajtásából, majd betakarításkor és több alkalommal az erjesztés későbbi szakaszaiban is.

Az eredmények statisztikai értékelésével (Pearson-féle korreláció és főkomponens-elemzés) az ivarzásindukálók felhasználása, a telep szaporodásbiológiája és a hígtrágya ösztrogénhatása közötti összefüggéseket tártunk fel.

Megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált gyógyszer-hatóanyag erős korrelációt mutatott a hígtrágya ösztrogénhatásával. A szántóföldi kísérletben igazoltuk, hogy a növények képesek az ösztrogénhatású anyagok akkumulációjára, többnyire a szakirodalomban ismert gyökér>hajtás(=szár+levél)>generatív termés sorrendben, mely esetben feltételezzük egy szűrőmechanizmus létezését a gyökér és a hajtás határán, mert több esetben igen jelentős gyökérbeli felhalmozódás is csak kis részben volt kimutatható a hajtásban. Néha azonban, és ebben a N-fejtrágyázás utáni minták domináltak, buja növekedés indul be, melynek során az ösztrogénanyagok mennyisége mind abszolút, mind relatív (szárazanyagra vetített) értelemben jelentősen megnő. A felhalmozódás a főkomponens-analízis által is igazoltan a későbbi fenofázisokban is tart, és üteme csak kissé csökken.

A legmagasabb értékeket éppen a betakarításkor vett mintákból kaptuk; 17ß-E2-t és E3-at szinte valamennyi kezelés talaj- és hajtásmintájából ki tudtunk mutatni (ezek a tendenciák leginkább az olaszperje esetében voltak megfigyelhetők). A frissen betakarított és a már hónapok óta erjedő silókukorica és olaszperje-fűszenázs EEQ-értéke között nem volt jelentős különbség, tehát a tejsavas erjedés az

ösztrogénanyagok mennyiségére nem volt hatással. Szalmás istállótrágya és hígtrágya összehasonlításában a kezelt növények EEQ-értéke nő, a hígtrágyával kezelteké lényegesen gyorsabban és nagyobb mértékben. Úgy tűnik, a magasabb szárazanyagtartalom, és itt különösen a szalmát és annak széntartalmát kell kiemelni, nagyobb pufferkapacitással jár a hígtrágyához képest és növeli a rendszer nitrogénlimitáltságát.

A toxikológiai csíratesztek többségében a hígtrágya még többszörös hígítás után is gátlást okozott, kivéve cirok esetében, ahol jelentős, akár 30%-os (hígítatlan, szeparált hígtrágya esetén 60%-os) serkentést tapasztaltunk. Ez azt mutatja, hogy a frissen, nagy mennyiségben hígtrágyázott területeken első kultúraként érdemes szemescirokkal próbálkozni.

Vizsgálataink alátámasztják, hogy a hígtrágya egy olyan anyag, melyet a szántóföldre történő kijuttatás előtt számos egyéb ok mellett a hormon- és gyógyszertartalma miatt is új kezelési módszerekkel kell ártalmatlanítani, nemcsak környezetvédelmi szempontból, hanem a humánegészségügyi kockázatok miatt is, valamint, hogy a megfelelő gyógyszerválasztással a hígtrágya hormonhatása redukálható.

Abstract

Compounds with estrogenic effect appearing in our environment may come from different sources. The intensive technologies of animal breeding are among the biggest sources of pollution. In our research, we investigated the ’estrogenic footprint’ of an intensive dairy cow farm near Budapest in Pest county, Hungary. Between 2017 and 2020, we measured the estrogenic effect of the resulting slurry on a quarterly basis, then followed the fate of 5 *oestrus*-inducing veterinary medicines (Alfaglandin, PGF, Dinolytic, Gonavet, Ovarelin) and their 3 active substances (D-Phe6-gonadorelin, chloprostenol and dinoprost-trometamin) from the use phase until their appearance in the slurry.

For screening estrogenic effects, we worked out and used extensively a test according to ISO 19040-1:2018 international standard, employing genetically modified yeast (*Saccharomyces cerevisiae* BJ3505) which contains human estrogen receptors. YES (Yeast Estrogen Screen) test turned out to be the main testing method of the doctoral research, supported by instrumental analytical measurements (UHPLC-FLD) in many cases. Besides, some of the samples were screened with supplementary toxicological tests, such as: transgenic zebrafish (*Brachydanio rerio* Tg(vtg mCherry)) fluorescence test for screening the production of vitellogenin, *Daphnia magna* 48-hour acute immobilization test, algal growth inhibition test (*Pseudokirchneriella subcapitata*), soil bacterium test *(Azotobacter agile, Pseudomonas fluorescens)* and seedling test (ISO 18763) for testing fitotoxicity employing seeds of 5 plant species (*Sorghum bicolor, Triticum aestivum* x *Secale cereale, Lepidium sativum, Sinapis alba, Fagopyrum esculentum*).

In small-scale field experiments, we tested two field-grown plants (*Zea mays*, *Lolium multiflorum*) for the accumulation of estrogenic materials (E1, 17α-E2, 17ß-E2, 17α-EE2, E3) on sites treated either with manure (2 doses) or with slurry (4 doses), in several fenophases. We sampled the soil, the roots, the shoots, the shoots during harvesting, and in several cases later on during the fermentation.

Statistically analysing the results with Pearson-correlation and main component analysis, we revealed correlations among the use of *oestrus*-inducers, the reproduction biology of the farm and the estrogenic effect of the slurry. We found that all three active medicine ingredients studied showed strong correlation with the estrogenic effect of the slurry. With the field experiment we proved that plants are able to accumulate materials with estrogenic effect, mainly, in accordance with the literature, in the root>shoot(=stem+leaves)>generative crop order. In that case we claim the existence of a filter mechanism at the root/shoot border, because, in several cases, very high- level accumulation of the estrogenic materials in the root could not be measured in that rate in the shoot samples.

In some cases, however, dominated by samples taken after the nitrogen treatment, lush growth started, after which the amount of estrogenic materials started to grow significantly, both in absolute and in relative (per dry weight) terms. Also proven by the main component analysis, the accumulation lasts in later fenophases, too, and its level decreases only slightly. We got the highest values from samples taken during the harvest; ß-E2 and E3 could be measured from almost all soil- and shoot samples of all treatments (tendencies described here are most valid in cases of *Lolium m.*).

There was no significant difference between the EEQ-values of the just-harvested plants and those of the samples taken after several months of fermentation. Therefore, fermentation with *lactic acid* did not affect the amount of estrogenic materials. In comparison of manure (faeces+straw) and slurry, EEQ-values of the treated plants grew, with significantly higher speed and level in cases of slurry. It seems that the higher dry mater content, with special emphasis on straw and its carbon content, results higher buffer capacity comparing to slurry and raises the nitrogen limitation of the system. In most cases of seedling tests, we experienced reduction in root growth, even for diluted slurry, except in case of *Sorghum*, with which we got stimulation of root growth by up to 30% (stimulation level for Sorghum, in case of undiluted, separated slurry was 60%). These results indicate that on sites just treated with slurry it is worth sowing *Sorghum* as first culture.

Our research underlines that slurry is a material which, before applying on agricultural fields, must be treated with new methods against its hormon- and medicine content, not only from the point of view of environmental protection but also from the perspective of human health; the simplest method to reduce its hormonal effect is to choose the right medicine.

1. Bevezetés

Az endokrin rendszert károsító vegyületek megjelenése a környezetünkben komoly aggodalomra ad okot, ugyanis negatív hatással lehetnek az élő szervezetekre. Ubiqueter szennyezők, tehát mindenütt előfordulhatnak, így globális problémát jelentenek. A biomonitoring tesztek azt mutatják, hogy az emberek 100%-ánál előfordul valamilyen hormonháztartást megzavaró vegyület (EDC) terhelés a vérben, vizeletben vagy a zsírszövetekben. Az ismert EDC-k mellett számtalan olyan vegyi anyag van, melyek EDC hatásúak, de még soha nem voltak tesztelve. A mikroorganizmusok és a növények képesek felvenni az EDC-ket a talajból és a vízből. Az állatok megeszik a növényeket, algákat, így átkerülnek ezek az anyagok az állatvilágba. A kisebb állatokból aztán a nagyobb állatokba kerülnek, a tápláléklánc tetején pedig az ember van. Indokoltan feltételezhető, hogy a kémiai anyagok növekvő termelése és felhasználása befolyással lehet az egyre gyakrabban előforduló endokrin eredetű betegségek megjelenésében.

Az ösztrogénhatású vegyületek egyre inkább elismert mikroszennyező vegyületek a környezetünkben, melyek veszélyt jelenthetnek a természetes ökoszisztémákra. Ezek a kémiai anyagok negatívan befolyásolhatják a vízi élővilágot és a vadon élő állatokra is negatív hatással lehetnek. Mivel legnagyobb mértékben a nemi funkciók működését befolyásolják az EDC-k, ezért csökkenthetik a populációk sűrűségét és a fajok biológiai sokféleségét. A természetbe való kerülésüknek fő forrása az ember és az állatok. A folyamatos ipari fejlődés következtében rengeteg olyan anyag kerül a környezetünkbe, melyek ösztrogén hatásúak. Sajnos nemcsak az ipar, de az egyre intenzívebb termelési módszereket használó mezőgazdaság is az egyik fő forrása lett a környezeti ösztrogéneknek. Az

intenzív állattartó telepeken keletkező hígtrágya, mely vizeletből, bélsárból, elcsurgó ivó- és technológiai vízből és egyéb hulladékokat tartalmazó anyagból álló melléktermék, azon kívül, hogy fontos tápanyagokat tartalmaz, megtalálhatóak benne még ösztrogénhatású vegyületek, antibiotikumok, gyulladáscsökkentők és egyéb kémiai anyagok is. A hígtrágya termőföldre juttatásával így a gyorsan hasznosuló tápanyagok mellett különböző kémiai szennyezőket is kijuttatunk.

Az EDC-k számos környezeti mátrixban jelen lehetnek, mint például a talajban, talaj- és felszíni vizekben, iszapokban, trágyákban. Éppen ezért a kutatásunkban azt vizsgáljuk, hogy az intenzív tejelő szarvasmarha telepről kikerülő hígtrágya milyen hatással van azokra a földterületekre és növényekre, amelyekre kijuttatják. A dolgozatban bemutatott vizsgálatok eredményeit a Yeast Estogen Screen (YES) élesztő teszt használatával kaptuk. Az EDC-k meghatározására egy genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* BJ 3505 élesztőgomba törzset alkalmaztunk. Vizsgáltuk a kijuttatott hígtrágya EDC tartalmát, továbbá azokat a talajokat, melyek befogadták az általunk vizsgált hígtrágyát. Időarányosan megvizsgáltuk az ezeken a talajokon termesztett olaszperje és silókukorica növények (gyökér, hajtás, szemtermés) ösztrogénhatását különböző fenofázisokban.

Doktori munkám Magyarországon új típusú kutatásnak számít, ugyanis nem laboratóriumi körülmények között, hanem szántóföldi, természetes adottságoknál vizsgáljuk az ösztrogének előfordulását, ahol a meteorológiai hatások (napsugárzás, eső, szél) befolyással vannak az ösztrogének bomlására. Úgy gondoljuk, ezzel a vizsgálattal valós képet kaphatunk az intenzív szarvasmarhatartás ösztrogénlábnyomáról.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A talaj, talajszennyezés

A talaj a Föld legkülső, szilárd burkát képezi, és a növények termőhelyéül szolgál. A földműveléssel és állattenyésztéssel foglalkozó ember rájött, hogy a talaj az egyik legfontosabb tényezője a sikeres gazdálkodásnak, ezért nagy figyelmet fordít rá. Meghatározó tulajdonsága a termőképesség, képes a növényeket tápanyagokkal és vízzel ellátni. A talaj az egyik legfontosabb természeti erőforrás, amely az anyagok zavartalan körforgásában megújulni képes. A mezőgazdaság termelőeszköze és a környezet része, mely elnyeli, tárolja vagy átalakítja a földfelszínre érkező energia és anyagáramlásokat (Stefanovits, 1992).

A talaj olyan természetes közeg, amely pufferként is funkcionál (Singh és Singh, 2020). Mivel természetes és antropogén hatásokra maga is folyamatosan változik, ezért a talaj minőségének az értékelésére folyamatosan szükség van (Maurya *et al.*, 2020).

Vermes (1995) és Simon (1999) szerint minden olyan folyamatot, amely során a talaj fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai kedvezőtlen irányban megváltoznak és az ökológiai funkciók károsodnak, talajszennyezésnek tekintünk. Leggyakrabban kémiai anyagok okozhatnak talajszennyeződést, a toxikus elemek és vegyületek felhalmozódásával (Vermes, 1995; Simon, 1999).

A talajszennyezés globális probléma a fejlett és fejlődő országokban egyaránt. A gyorsan fejlődő gazdasággal rendelkező országok jelentős talajszennyezési problémákkal néznek szembe a felgyorsult iparosodás és urbanizáció következtében (Sun *et al.*, 2018).

Legnagyobb mértékben ezek antropogén (emberi) eredetűek, melyek pontszerű vagy diffúz (nem pontszerű) szennyezést okoznak a talajban. Pontszerű antropogén talajszennyeződéshez soroljuk a szennyvizek, szennyvíziszapok, hígtrágyák, istállótrágyák, folyékony és szilárd hulladékok következtében kialakult minőségromlást. Diffúz antropogén szennyeződést okoznak a légszennyezésből eredő nedves és száraz kiülepedések, a mezőgazdaságban felhasznált vegyszerek (növényvédő szerek, műtrágyák). Az emberi tevékenység hatására a talajba kerülnek még kőolaj és kőolajszármazékok, szervetlen makroszennyezők, szerves mikroszennyezők, nehézfémek és radioaktív anyagok is (Kádár, 1995; Vermes, 1995; Simon, 1999,).

Az állati trágyával különböző gyógyszerhatóanyagok is talajba kerülnek, ami elősegítheti például az antibiotikum-rezisztencia terjedését a talajból a táplálékláncon keresztül az emberre (Lu *et al.*, 2021).

2.2. A hígtrágya

A hígtrágya az almozás nélküli állattartás jellegzetes, folyékony halmazállapotú melléktermék, amely állati bélsárból, vizeletből, elcsurgó ivó- és technológiai vízből, valamint kis mennyiségben egyéb hulladék anyagokból áll. Ennek a trágyaféleségnek a megjelenése hazánkban az 1970-es évek elejére tehető a nagyüzemi állattartó telepek létesítésével párhuzamosan (Vermes, 2005).

A hígtrágyát az alkalmazott technológiák képesek különböző mértékben a szilárd és folyékony alkotórészeire elkülöníteni. A szilárd fázis kiszűrhető, kiülepíthető, mely szikkadás után az almos trágyához hasonló módon kezelhető. A visszamaradt híg szuszpenzió nem azonos a trágyalével, mivel kevesebb tápanyagot tartalmaz. Ennek következtében a

hígtrágyát töménysége alapján is osztályozhatjuk. Megkülönböztetünk teljes hígtrágyát (kizárólag vizelet és bélsár keveréke), kövér hígtrágyát (az ürüléken kívül tartalmaz még technológiai és csurgalék vizet), tovább higított hígtrágya (a kövér vagy sovány hígtrágya öntözővízzel való keverése) (Csávás *et al.*, 1975). A hígtrágyák tápanyag-tartalmukban és hatásaikban is alapvetően különböznek az istállótrágyától. A szűk C:N arányuk (5-14:1) alapvetően meghatározza a hígtrágyák alkalmazásának feltételeit. Kedvezőtlen körülmények mellett (meleg időjárás, a kijuttatott hígtrágya talajba munkálásának megkésése) a hígtrágya ammónia-nitrogén tartalmának akár 100%-a is elillanhat. A folyamat a közvetlen gazdasági kár mellett egyben környezetszennyező is (Kalocsai *et al.*, 2007).

2.2.1. Az istállótrágya és hígtrágya hatásai a talajra

Az istállótrágya és hígtrágya a tápanyag szolgáltató képességén keresztül tud hatást gyakorolni a talajra, azonban jótékony hatásaik túlnőnek a közvetlen tápanyagellátáson. A gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy a nagy műtrágyaadagokat használó növénytermesztésben is nélkülözhetetlen az istállótrágyázás, ugyanis a szerves anyaggal kijuttatott széntartalom jelentős energiaforrást biztosít a talajokban lejátszódó mikrobiális folyamatok számára. A rendszeres trágyázással javítani tudjuk talajaink szerkezetét, emellett pedig kedvezően hatunk a talaj három fázisú (szilárd, folyékony és légnemű) rendszerének működésére. A fenntartható növénytermesztés alappillérének tekintjük a hatékony és jó minőségben elvégzett szervestrágyázást (Kalocsai *et al.*, 2007).

2.3. Az endokrin rendszer, és azokat károsító vegyületek

Az endokrin rendszert a testben található mirigyek alkotják, melyek egy vagy több hormont termelnek. A hormonok természetes vegyi anyagok, melyek a keringési rendszer segítségével a véráramon keresztül jutnak el a célszövetekhez vagy szervekhez, ahol kifejtik hatásukat (Gore *et al.,* 2014). A hormonok az adott receptorokhoz kötődnek és befolyásolják a gének expresszióját, a sejtek differenciálódását, a hormonok szekrécióját és más folyamatokat. Ennek eredményeként szabályozottak olyan biológiai funkciók, mint például a növekedés, fejlődés, szexuális differenciálódás és a szaporodás (Fang *et al.,* 2000).

Az endokrin rendszert károsító vegyületeket (EDC) az Endokrin Társaság (endocine.org) tudósai és orvosai exogén (nem természetes) vegyi anyagnak vagy vegyi anyagok keverékének tartja, melyek befolyásolják a hormonrendszer normális működését (Zoeller *et al.,* 2012). Az Európai Unióban 150 szintetikus vegyületet és hét természetes vegyületet sorolnak az EDC-k közé (Burkhardt-Holm, 2010). Tehát az endokrin rendszert károsító vegyületek lehetnek természetes vagy szintetikus anyagok.

Eredetük alapján az ösztrogénhatású vegyületeket következőképpen tudjuk osztályozni:

1. Természetes hormonok és metabolitjaik (pl. 17β-ösztradiol (17β-E2), ösztriol (E3)).
2. Fito- és mikoösztrogének (pl. izoflavonok, lignánok, genisztein).
3. Növényvédő szerek és metabolitjaik (pl. DDT, metoxiklór, dieldrin, toxafén, endoszulfán).

4. Ipari és háztartási vegyszerek (pl. alkil-fenol-etoxilát, tisztítószerek, tűzálló szerek, lágyító anyagok, mint például biszfenol-A, ftalátok, poliklórozott bisz-fenolok (PCB-k)).
5. Mesterséges hormonok (pl. dietilstilbösztrol, fogamzásgátló tabletták, pajzsmirigy gyógyszerek).
6. Hormon mellékhatással rendelkező gyógyszerek (pl. naproxén, klofibrát)
7. Ipari és háztartási folyamatok melléktermékei (pl. policiklusos aromás szénhidrogének, dioxinok).
8. Nehézfémek (pl. kadmium, ólom) (Markey *et al.*, 2002).

Ezen felsorolásból néhányat szeretnék csak kiemelni (az első négy csoportba tartozók közül) és részletezni a későbbiekben. Az EDC-k hatása az élő szervezetekre összetett. Általánosságban az EDC-k négy különböző módon **befolyásolhatják a szervezet működését:**

1. Kötődhetnek a receptorhoz, és aktiválhatják a válaszreakciót a hormont utánozva – agonista hatás.
2. Kötődhetnek a receptorhoz, de nem aktiválják a válaszreakciót – antagonista hatás.
3. Közvetlenül vagy közvetve kölcsönhatásba léphetnek a hormonok szerkezetével, így befolyásolva a hormonok kötődését a receptorokhoz.
4. Zavarhatják a hormonszintézist vagy az anyagcserét és módosíthatják a hormon-receptor szintjét (Sonnenschein és Soto, 1998; Vos *et al.*, 2000; Baker, 2001).

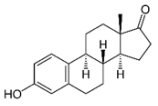
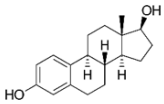
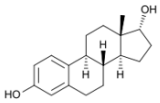
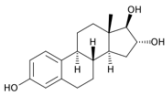
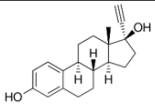
2.3.1. Ösztrogének

Az ösztrogének (17β-E2, E1, E3) túlnyomórészt női hormonok, melyek a reproduktív szövetek, az emlő, a bőr és az agy egészséges fenntartásáért felelősek. A férfiakban a herék csak kis mennyiségű ösztrogént termelnek. Az ösztrogének aromás gyűrűvel és hidroxil csoporttal rendelkeznek. A szintetikus ösztrogénekben etinil (etinil-ösztradiol, 17α-EE2) és metilcsoport (mestranol) is található, melyek a fogamzásgátlókban alkalmazott vegyületek (Lai *et al.*, 2000).

Az ösztrogének lebontása a májban történik, ahol szulfát, glükoronid vagy szulfo-glükoronid csoporttal konjugálódnak. Ez növeli a vízoldhatóságot, így a vizelettel ezek az anyagok ürülni tudnak. A szabad, nem konjugált ösztrogénformák pedig a széklettel tudnak kiválasztódni (Sandor és Mehdi, 1979). A szabad ösztrogének közül a 17β-E2 a legaktívabb, ezt követi az ösztron és ösztriol. A konjugált ösztrogének nagyon alacsony ösztrogén aktivitással rendelkeznek a nem konjugált formákhoz képest (Bovee *et al.*, 2004). Ennek ellenére a kiválasztódás után a konjugált ösztrogének például fekál baktériumok jelenlétében képesek átalakulni az ösztrogének más formáiba (Combalbert és Hernandez-Raquet, 2010; Hong, 2012).

A természetes és szintetikus ösztrogének

Az ösztrogének biológiailag aktív hormonok, amelyek koleszterinből származnak és a mellékvesekéregben, a herékben, a petefészekben és a placentában szabadulnak fel. A szteroid ösztrogéneket természetes vagy szintetikus hormonként lehet osztályozni; szerkezeti képletüket az 1. ábra szemlélteti.

				
Ösztron	**17β-ösztradiol**	**17α-ösztradiol**	**Ösztriol**	**Etinilösztradiol**
E1	**17β-E2**	**17α-E2**	**E3**	**17α-EE2**
Természetes ösztrogének				Szintetikus ösztrogén

1. Ábra: A természetes és szintetikus ösztrogének kémiai struktúrája

Az ösztrogén nemcsak reproduktív hormon, hanem a test szinte minden szövetére kifejti hatását. Összefüggésbe hozható a rák, az endometriózis, az elhízás, az inzulinrezisztencia, a szív- és érrendszeri, autoimmun és neurodegeneratív betegségek kialakulásával. Az ösztrogének három típusú receptoron képesek hatni a szervezetben, a klasszikus ERα-n és az ERβ-n, valamint a nemrégiben felfedezett, nem-klasszikus, G-fehérjéhez kapcsolt membránreceptor 30-on, a GPR30-on (Arnal *et al.*, 2017).

2.3.2. Fitoösztrogének

A fitoösztrogének növényi eredetű vegyületek, melyek képesek kötődni az ösztrogén receptorokhoz és ösztrogénszerű, vagy ösztrogénellenes hatást képesek kifejteni. Az emberek folyamatosan kapcsolatban vannak a fitoösztrogénekkel, ugyanis a növényi táplálékok, mint például a hüvelyesek, különféle magvak és a teljes kiőrlésű gabonák fitoösztrogéneket tartalmaznak. A tradicionális kelet-ázsiai konyhaművészet is bőséges forrása a fitoösztrogéneknek. Más ösztrogénekkel ellentétben a fitoösztrogének nem bioakkumulálódnak (raktározódnak) az élő szervezetekben, viszonylag gyorsan lebomlanak és kiválasztódnak (Watanabe *et al.*, 1998; Manach és Donovan, 2004). A fitoösztrogének lehetnek kromén származékok, flavonoidok,

izoflavonoidok, izokumarinok, kalkonok, kumesztánok, stilbének, lignánok, ginzenozidok, tetrahidrofurandiolok, fahéjsav származékok, 2-arilbenzofuránok és számos egyéb fenolos vegyület. Az emberek legnagyobb mennyiségben az izoflavonoidok (főleg hüvelyesek) és a lignánok (majdnem minden növényben található) csoportjába tartozó fitoösztrogéneket fogyasztják (Reinli és Block, 1996; Adlercreutz és Mazur, 1997). A fitoösztrogének gyenge ösztrogén aktivitást mutatnak a 17β-ösztradiollal szemben. Bovee és munkatársai (2004) hatásuk szerint a következőképpen sorolja be a fitoösztrogéneket: 17β-E2 >> kumesztrol> genisztein> zearalenon> 8-prenil-naringenin >> daidzein> naringenin> genistin >> daidzin. Annak ellenére, hogy a fitoösztrogének hatékonysága nagyon gyenge, ezek a testben 100-szor magasabb koncentrációban is jelen lehetnek, mint az endogén ösztrogének (Adlercreutz *et al.*, 1986). Például a fitoösztrogének közül a genistein és daidzein koncentrációja a vizeletben kb. 500-szor magasabb lehet a szójatejjel táplált csecsemőknél, mint azoknál, akik tehéntejet ittak (Cao *et al.*, 2009). Ezért figyelembe kell venni a fitoösztrogének endokrin rendszerre gyakorolt esetleges hatását.

2.3.3. Növényvédőszerek (peszticidek)

A peszticidek növényvédő szerek, melyeknek a használatával megakadályozzák vagy csökkentik a kórokozók és a kártevők bizonyos csoportjának (rovarok, gombák, gyomok) negatív hatásait az adott kultúrára. Az intenzív mezőgazdaság nagy mennyiségekben használja, hogy kellőképpen ki tudja elégíteni a növekvő emberi populáció igényeit (Nsibande és Forbes, 2016). A gyors urbanizációnak köszönhetően, ami azt jelenti, hogy kisebb földterületeken kell magasabb hozamú növényeket termeszteni, valószínűsíthetővé teszi, hogy a peszticidek felhasználása növekedni fog a jövőben (Tankiewicz *et al.*, 2011).

A peszticideket két fő csoportba tudjuk sorolni, vannak a: 1. vegyi peszticidek és a 2. biopeszticidek. A *kémiai (vegyi) peszticidek* alapvetően szintetikus anyagok, melyek lehetnek – rovarirtók, - herbicidek (gyomirtó szerek), - fungicidek (gombaölő szerek), - rágcsálóirtók, vagy – nematicidek (fonálféreg-irtó). A *biopeszticidek* olyan növényvédő szerek, amelyek természetes forrásból származó anyagokból készülnek, mint például állati, növényi kivonatokból, baktériumokból vagy ásványi anyagokból. A legismertebb biopeszticidek közé tartozik a repceolaj és a szódabikarbóna.

A növényvédőszerek 4 fő családba sorolhatók, vannak: organoklór, organofoszfor, karbamát és piretroid formájú szerek. Az organoklór peszticidek a leginkább perzisztens, magas toxicitású, lipofilitású és bioakkumulációjú vegyi anyagok. Ezenkívül az organoklór vegyületek ösztrogén és karcinogén hatásúak is (Taylor *et al.,* 2013). Nagyon hosszú felezési idejük van, körülbelül 10-30 év (Padrón *et al.,* 2006). Európában, Észak-Amerikában és Dél-Amerika több országában is betiltották ezeknek az anyagoknak a mezőgazdasági és háztartási használatát. Néhány más országban azonban a mai napig is alkalmazzák ezeket az anyagokat korlátozott mértékben, például a DDT-t a malária visszaszorítására jelenleg is használják (Tankiewicz *et al.,* 2011; Samsidar *et al.,* 2018).

Régóta ismert a peszticidek endokrin rendszerre gyakorolt hatása. A DDT, heptaklór, endoszulfán, klordán, dikofil és a lindán olyan környezeti ösztrogének, melyek pl. aligátoroknál különböző fejlődési rendellenességeket idézhetnek elő (Fry, 1995; Vonier *et al.,* 1996). Több tanulmány is foglalkozik azzal a ténnyel, hogy a DDT hím halakban

indukálja a vitellogenin (VTG) termelést; lásd később (Jobling és Sumpter, 1993).

A mezőgazdaságban használt peszticidek a felszíni és felszín alatti víztestekbe juthatnak, ahol lipofil jellegük miatt tartósan fennmaradhatnak és a vízi szervezetekben felhalmozódhatnak (Okoumassoun *et al.*, 2002).

2.3.4. Ftalátok

A Ftalátok (PAE) kémiai vegyületek, melyeket széles körben használnak lágyító szerként műanyag termékek gyártásához és feldolgozásához. A ftalátok előállítása az 1920-as években kezdődött, és az 1950-es években terjedt el, amikor elkezdték használni polivinil-klorid (PVC) adalékként (Kimber és Dearman, 2010). A ftalátokat széles körben használják az iparban. A gyártási folyamatok során és a termékek ártalmatlanításakor (hulladékégetés) is könnyen felszabadulhatnak a környezetünkben (Simoneit *et al.*, 2005).

Mindenhonnan ki tudják ezeket az anyagokat mutatni, a légköri aerosolokból (Fu *et al.*, 2009), a szennyvizekből, szennyvíziszapokból (Dargnat *et al.*, 2009), folyami- és tengeri vízből (Net *et al.*, 2014), sőt még az ivóvízből is (Gao *et al.*, 2014). Egyes PAE-k endokrin rendszert károsító vegyületek lehetnek, ezért jelenlétük a környezetünkben figyelmet igényel. Az Európai Unió (EU) és az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (US EPA) a prioritást élvező szennyezőanyagok listáján tartja számon a ftalátokat (CEC, 2000).

A PAE-k ösztrogénpotenciálja jóval gyengébb, mint a 17β-ösztradiolé és a következő sorrendben csökken: Butilbenzil-ftalát > dibutil-ftalát > diizobutil-ftalát > dietil-ftalát > diiszononil-ftalát (Harrison *et al.*, 1997).

A ftalátok eredetük alapján lehetnek di-n-butil- ftalátok és di(2-etil-hexil)-ftalátok. Kinyerhetők vörös algákból is (Chen, 2004), de a természetes eredetű ftalátok mennyisége elhanyagolható az emberi tevékenységek által termelt PAE-khez képest (Schiedek, 1995). A PAE-k nagyon sokféle anyagban és termékben megtalálhatók, beleértve a PVC termékeket, építőanyagokat (festékek, ragasztók), kozmetikai termékek (parfümök, hidratálók, folyékony szappan, hajápolók), orvostechnikai eszközök, mosó- és tisztítószerek, csomagoló anyagok, gyermekjátékok, nyomdafestékek, gyógyszerek és élelmiszeripari termékek, tisztítószerek. Az alacsony molekulasúlyú PAE-k, mint például a dimetil-ftalát, a dietil-ftalát és a di-n-butil-ftalát az ipari oldószerek, parfümök, ragasztók, viaszok, tinták, gyógyszeripari termékek, rovarirtó anyagok és a kozmetikumok alkotóeleme. A hosszabb alkil-lánccal rendelkező PAE-ket lágyítóként használják a műanyagiparban, mivel megmunkálhatóbbá, rugalmasabbá teszik az anyagot, a PAE-k 80%-át erre a célra használják (Koniecki *et al.*, 2011).

Németországi minták eredményeiből tudjuk, hogy a di (2-etil-hexil)-ftalátok fordulnak elő legnagyobb koncentrációban a környezetünkben. A felszíni vizekben 0,33-97,8 μg/l, szennyvíz tisztítók kifolyóiban 1,74-182 μg/l, szennyvíziszapban 27,9-154 mg/kg, és üledékekben 0,21-8,44 mg/kg koncentrációban mutatták ki (Fromme *et al.*, 2002).

A ftalátokat nagy lipofilitás jellemzi, így nehezen oldódnak a vízben, viszont az üledékekben, szilárd anyagokban képesek felszívódni. A lipofil jelleg miatt a magas olaj- és zsírtartalmú élelmiszerekben képesek akkumulálódni, mint például a tejszínben, vajban, sajtban (Sharman *et al.*,

1994). Ezen kívül felhalmozódhatnak sertések és brojlercsibék testszöveteiben és szerveiben (Jarosová, 2006).

A ftalátok előfordulásától és felhasználásától függően az emberek ki vannak téve a befolyásuknak a mindennapi élet során. Ezért az Európai Élelmezési Bizottság 1991-ben meghatározta a tolerálható napi bevitel szintet az embereknél, amely 25 µg és 50 µg között van testtömeg kg/nap (Hong, 2012).

2.3.5. Biszfenol-A

A biszfenol-A (BPA, 2,2-bisz(4-hidroxifenil) propán) az egyik legnagyobb mennyiségben termelt vegyi anyag a világon (Vandenberg *et al.*, 2007). A BPA-t polikarbonát műanyagok és epoxigyanták előállításához, valamint különféle fogyasztási cikkek, mint például élelmiszer tároló edények, vízcsövek, játékok, orvosi berendezések, elektronikai cikkek gyártásához használják. A BPA mindenütt jelen van környezetünkben, jelenlétét kimutatták az emberi vérből, vizeletből, a placenta szövetéből, köldökzsinór vérből és az anyatejből is (Rochester, 2013).

A BPA káros hatással lehet a szaporodásra, egyedfejlődésre, az idegrendszerre, valamint a kardiovaszkuláris-, anyagcsere-, és immunrendszerre (Vom Saal *et al.*, 2007). Az emberek széles körű expozíciója és az azzal járó egészségügyi kockázatok miatt Észak-Amerikában és az Európai Unióban rendeletet hoztak ezen anyagok felhasználására. 2010-ben Kanadában megtiltották a BPA-t tartalmazó polikarbonát csecsemők részére készített palackok behozatalát és értékesítését (Government of Canada, 2010).

Az Európai Unió 2011 óta tiltotta be a BPA használatát csecsemők etető palackjaiban, és számos helyen elkezdték helyettesíteni a BPA-t más vegyi anyagokkal. Összesen 16 biszfenol-analógot dokumentálnak ipari felhasználásra. A BPF (4,4-metilén-difenol), BPS (4-hidroxi-fenil-szulfon) és a BPAF (4,4-hexafluorizopropilidén difenol) a BPA-k fő helyettesítői a polikarbonát műanyagok és az epoxi gyanták gyártásában. A BPF-eket széleskörűen használják lakkok, ragasztók, vízcsövek, fogászati tömésekként, fogpótlásra (Cabaton *et al.,* 2009). A BPS-t általában epoxi ragasztókban használják, illetve színezékekben és különböző cserzőanyagokban (Naderi *et al.,* 2014). A BPAF-t főleg elektronikai cikkekben és az optikai szálakban használják (Matsushima *et al.,* 2010).

A BPA kimutatható a felszíni és felszín alatti vizeinkben, szennyvizekben és szennyvíziszapokban is. Ösztrogénhatása a 17β-ösztradioltól négy-hat nagyságrenddel gyengébb (Bergeron *et al.,* 1999; Schafer *et al.,* 1999).

2.3.6. Alkilfenolok

A nemionos felületaktív anyagok egyik fő csoportja a 4-alkil-fenoletoxilat (APEO) (Raecker *et al.,* 2011). A leggyakoribb APEO-k az oktil-fenol-etoxilát, a nonil-fenol-etoxilát és a dodecil-fenol-etoxilát (White 1994). Ezeket a felületaktív anyagokat széles körben használják tisztítószerekben és különböző ipari folyamatok segédanyagaként. Például diszpergálószerként a papír és cellulózgyártásban, emulgálószerként latexfestékekben és peszticid készítményekben, flotációs szerként, ipari tisztítószerként, de autók hidegtisztítószerei és háztartási tisztítószerek is tartalmazzák (Thiele *et al.,* 1997; Liu *et al.,* 2018).

A legtöbb APEO vizes oldatban használják, így bekerülnek a települési és ipari szennyvizekbe is. Az APEO-k összetett biológiai lebomlási folyamaton mennek keresztül a szennyvíztisztítás során, melynek hatására számos mikroorganizmus metabolizálja az APEO-kat. Etoxiláncuk révén több bomlástermék keletkezik, ezek a bomlástermékek mérgezőek, perzisztensek és bioakkumulatívak. Az oktilfenol és a nonilfenol elsőbbségi veszélyes anyagként szerepel az Európai Unió Víz Keretirányelvében (Acir *et al.*, 2018). Számos környezeti mátrixban megtalálhatóak, például szennyvíztisztítók befolyó és kifolyó vizében, felszíni és felszínalatti vizekben, üledékekben, talajokban és az élelmiszerekben is (Zhong *et al.*, 2017; Hao *et al.*, 2018). A nonilfenolok például úgy működnek, mint a 17β-ösztradiol női hormon, az ösztrogénreceptorhoz kötődve kompetitív módon szorítják ki a 17β-ösztradiol-t (White, 1994).

2.4. Ösztrogének a környezetünkben

A világ több mint 7 milliárd főből álló lakossága körülbelül 30 000 kg/év természetes szteroid ösztrogént (E1, 17β-E2 és E3) és további 700 kg/év szintetikus ösztrogént (17α-EE2) kizárólag fogamzásgátlók által juttat a természetbe. Azonban az állattartásból származó ösztrogének jóval nagyobb mennyiséget tesznek ki. Például az Egyesült Államok és az Európai Unió, állatállományának éves ösztrogén kibocsátása, 83 000 kg/év, az emberi kibocsátás több mint kétszerese (Shrestha *et al.*, 2012). A vegyületek ösztrogén potenciálját legtöbbször a 17β-E2 referencia vegyülethez viszonyított relatív potenciálként fejezik ki. Meghatározó szerepe van a vegyületek minőségének, ugyanis az egyes ösztrogénhatású vegyületek különböző hatással lehetnek a receptorokra. Coldham és munkatársai (1997) kutatásából tudjuk, hogy a 17β-E2 (100%) ösztrogén

potenciáljához képest, a következőképpen alakul az EDC vegyületek receptor affinitása: 17α-EE2 (88,8%), E1 (9,6%), 17α-E2 (5,25%), E3 (0,63%), BPA (0,005%).

Wei és munkatársai (2011) Észak-kínai tejelő és hízó szarvasmarha telepen vizsgálták a trágyában előforduló ösztrogéneket. Megállapították, hogy a négy természetes ösztrogénből három megtalálható volt 17 tejelő telep trágyájában. Egyik telepen sem mutattak ki E3-at, viszont E1 a legmagasabb koncentrációban volt az összes tejelő telepen. 17α-E2 és 17β-E2 a minták 70 %-ában kimutatható volt. A 17α-E2, 17β-E2, és E1 átlagosan 194,6 μg/kg, 104,4 μg/kg, 262,2 μg/kg mennyiségben fordultak elő a mintákban (Wei *et al.,* 2011).

A hízómarhák ürülékéből is kimutatható volt a 17α-E2, 17β-E2, és E1. A 17α-E2 esetében a mennyisége 0 μg/kg-tól egészen 260 μg/kg-ig, a 17β-E2-nél szintén a 0 μg/kg-tól 242,5 μg/kg-ig és az E1 pedig 103,1-507,5 μg/kg-ig terjedt. Átlagértékenként tehát: 104,5 μg/kg, 67,7 μg/kg és 216,4 μg/kg. Az E3 nem volt kimutatható a vizsgált mintákban (Hutchins *et al.,* 2007; Zheng *et al.,* 2008). A 17α-E2, 17β-E2, és E1 átlagos koncentrációja a tejelő szarvasmarha székletében 86,3%, 54,2% és 21,2%-kal volt magasabb, mint a hízó marha székletében (Zheng *et al.,* 2008).

A három ösztrogén koncentrációjának viszonylag nagy eltérése azt mutatja, hogy a szarvasmarha életkora, neme, szaporodási ciklusa, vemhességi stádiuma jelentős különbséget okozhat a trágyában található ösztrogének mennyiségében. Hanselman és munkatársai (2003) a tanulmányukban leírják, hogy egy 1000 kg tömegű, nem vemhes vagy 80 nap alatti vemhes szarvasmarha 300-600 μg/nap, míg egy 1000 kg-os 80 nap feletti vemhes szarvasmarha 1500-11400 μg/nap ösztrogént választ ki.

Johnson és munkatársai (2006) becslése szerint egy tejelő tehén átlagosan 384 mg 17β-E2 juttat naponta a környezetébe csupán a vizelettel és a széklettel, míg egy vemhes koca 700-17 000 mg ösztront (E1) üríthet a vizelettel napi szinten.

Az ösztrogének bomlási ideje elsősorban a degradációs körülmények mértékétől függ. Nyilvánvaló, hogy minél hosszabb a szennyezőanyag bomlási ideje, annál tartósabb lesz a környezetben. Az emberekben és állatokban kiválasztódó szteroidális ösztrogének (E1, 17β-E2, E3) rövid felezési idejűek. Mivel hidrofóbok, ezért koncentrációjuk csökken a vizes fázisokban és felezési idejük 2-6 nap vizes és üledékes közegben (Ying *et al.,* 2002). Az 17β-E2 és 17α-EE2 aerob körülmények között 2-81 nap alatt bomlik le, míg anaerob körülmények között egyik sem bomlik. Ez azt jelenti, hogy az oxidatív állapot jelentősen befolyásolja a degradáció sebességét (Ying *et al.,* 2003). Egy másik tanulmány szerint aerob talajban az 17β-E2 15 napon belül lebomlik, és a felezési ideje 3-4,5 nap, anaerob talajban a lebomlás viszont nagyon lassú, felezési ideje 24 nap körüli (Ying és Kookana, 2005). A környezetben jelenlévő bizonyos baktériumok (*Rhodococcus zopfii* és *Rhodococcus equi* szennyvíziszapban) képesek teljes mértékben lebontani a természetes ösztrogéneket (E1 és 17β-E2) akár 24 órán belül (Khanal *et al.,* 2007; Hamid és Eskicioglu, 2012).

Számos más tényező is befolyásolhatja az ösztrogének felezési idejét, mint például a hidrofób részecskék, kovalens kötések, ligandumcsere és migráció a talajrészecskék mikrorendszerein. A 17β-E2 és 17α-EE2 hajlamosak fotokatalízis és fotolízis által bomlani, vízi környezetben (Writer *et al.,* 2012; Petrie *et al.,* 2013).

A 17α-EE2 lebomlását az USA-ban tanulmányozták. Aerob körülmények között a felezési időt 108 napra becsülték. Megfigyelték,

hogy természetes napfényben a 17α-EE2 felezési ideje jóval rövidebb lett (Zuo *et al.,* 2013), és megállapították, hogy a szintetikus ösztrogének sokkal perzisztensebbek, mint a természetes ösztrogének.

Világszerte csökkennek az élőlények egyedszámai. Az elmúlt 100 évben 785 faj, köztük emlősök, tengeri madarak, halak, rákfélék haltak ki vagy kerültek a kihalás szélére (Stork, 2010). Ennek számos oka van, a természeti erőforrásaink túlhasználata, élőhelyek elvesztése, éghajlatváltozás, különböző betegségek és szennyezőanyagok jelenléte a környezetünkben. Több kutatás is azt mutatja, hogy az EDC szennyezés potenciálisan hozzájárul a vadon élő állatok számának csökkenéséhez (Mills és Chichester, 2005).

Az EDC-k több káros hatással is bírnak, mint például megzavarhatják a hormonrendszer működését, csökkenthetik az immunrendszer hatékonyságát, fejlődési rendellenességeket idézhetnek elő, a legelterjedtebb negatív hatás pedig a reproduktív rendszer diszfunkciója, amely a termékenység csökkenését és a szexuális viselkedés megváltozását okozhatja (Zhou *et al.,* 2009).

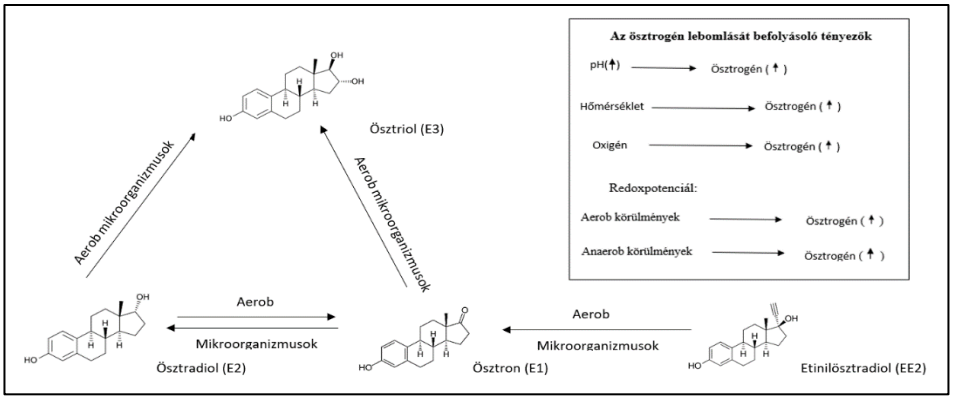
2.4.1. Ösztrogének a talajban

Az ösztrogének leggyakrabban állati trágyával vagy szennyvíziszappal kerülnek be a talajba (Kakaley *et al*., 2020). A talajban való mozgásuk során előbb a pórusvízbe mosódnak az öntöző vagy csapadékvízzel, majd onnan a talajvízbe mosódhatnak le. Kimosódás útján a felszíni vizekbe kerülhetnek (Cerna *et al*.,2022), vagy a talajszemcsékhez kötődhetnek szorbció útján. Bizonyos ösztrogének (pl. E1) akár több mint két hónapig is a talajban maradhatnak (Caron *et al*., 2010).

Számos tanulmány szerint az E1 a 17β-E2 fő biodegradációs közti terméke. Xuan és munkatársai (2008) tanulmánya alátámasztja, hogy iszapos talajban, abiotikus körülmények között az 17β-E2 biodegradáció egyik közti terméke az E1 volt (Xuan *et al.,* 2008). Masthare és munkatársai (2013) vizsgálatai szerint a 17α-E2 és a 17β-E2 szintje exponenciálisan csökkent a talajmintákban, ezzel párhuzamosan előbb ugrásszerűen, majd csökkenő mennyiségben volt jelen az E1 mint degradációs metabolit (Masthare *et al*., 2013).

Öntözés esetén a 17α-E2 koncentráció csökkenését, az E1 és a 17β-E2 ekvivalens növekedését figyelték meg, mely a mikrobiális enzimek katalitikus hatására enged következtetni (Mansell *et al.*, 2011).

A talajban a 17β-E2-bomlás üteme folyamatosan növekszik, ahogy a talajnedvesség megnövekszik, így száraz körülmények között az ösztrogének magasabb koncentrációban is fennmaradhatnak (Xuan *et al.*, 2008; Mansell *et al*., 2011).



2. Ábra: Ösztrogének transzformációja aerob mikrooganizmusok jelenlétében (Forrás: Adeel *et al.,* 2017)

Az E1, a 17β-E2 és az E3 képes egymásba átalakulni, melyet a 2. ábrával szemléltetünk. Egyes mikrobák (például nitrifikáló baktériumok) képesek E1-et E3-á alakítani és a szintetikus 17α-EE2 átalakítható E1-é a *Sphingobacterium sp.* jelenlétében (Haiyan *et al.,* 2007). Tóvizek üledékében, anaerob körülmények között az 17β-E2 metanogén, szulfát-, vas- és nitrát- redukáló körülmények között E1-gyé alakult át, viszont a 17α-EE2 nem bomlik le (Czajka és Londry, 2006).

2.4.2. A növények ösztrogén felvétele

A szervestrágya mezőgazdasági területekre történő kijuttatása általánosan elfogadott gyakorlat a világban. Ennek eredményeként a szteroid ösztrogének (SE) könnyen bejutottak azokba a talajokba, melyek szerves trágyázásban részesültek vagy szennyvízzel voltak kezelve. Ezeknek a talajoknak az SE szintje így elérheti a több száz, de még a több ezer ng/kg-ot is (Zhang *et al.,* 2015; Gudda *et al.,* 2022). Ez potenciális kockázatot jelent a mezőgazdasági termelésre, az élelmiszerláncon keresztül pedig hatást fejthet ki az emberek egészségére (Erdal és Dumlupinar, 2011).

Jól ismert, hogy bizonyos növények képesek a környezetükből szennyező anyagokat felvenni anélkül, hogy ez bármilyen negatív hatással lenne a fejlődésükre. Ezt a mechanizmust fitoextrakciónak nevezzük. Számos növényfajt ismerünk, melyek alkalmazkodtak a nehézfémekhez, de sajnos kevés információnk van olyan növényekről, melyek az ösztrogének felhalmozására képesek (Adeel *et al.,* 2017). Az elmúlt években több tanulmány is bebizonyította, hogy az SE-k felvehetők és felhalmozódhatnak a hidrofitákban (vízi növények) és a mezőgazdasági növényekben is. Például az E1-et és a 17α-EE2-t felveheti a bab (Erdal és

Dumlupinar, 2011), kukorica (Card *et al.,* 2013), a saláta (Adeel *et al.,*2018) és a retek is (Li *et al.,* 2019).

A szennyvízzel végzett folyamatos áramlási tesztek azt mutatják, hogy az algák és a békalencsék kulcsszerepet játszanak az ösztrogének eltávolításában (Shi *et al.,* 2010). Kukoricával végzett kísérletekből kiderült, hogy a szintetikus és természetes ösztrogének megjelennek a kukorica gyökerében, de csak a 17β-E2-t tudták kimutatni a kukorica szárában. A sandbar fűz (*Salix exigua*) és a lúdfű (*Arabidopsis thaliana)* szintén képesek ösztrogén felvételre. (Franks, 2006). Egy japánban végzett hidroponikus vizsgálatban száz különböző növényt vizsgáltak ösztrogénhatású anyagok jelenlétében, de csak a kövér porcsin (*Portulaca oleracea*) volt az egyetlen hatékony fitoremediátor. Eltávolította a fenolcsoportot tartalmazó EDC-ket, beleértve a 17β-E2-t 24 órán belül (Imai *et al.,* 2007). Ezért fontos megérteni a növények ösztrogénfelvételének abszorpciós és akkumulációs mechanizmusát. A szerves vegyi anyagokat a növények aktív és/vagy passzív folyamatok révén vehetik fel, ami leginkább a vegyületek és a növények tulajdonságaitól függ (Collins *et al.,* 2006). A szerves vegyi anyagok tulajdonságain túl a növények jellemzői, mint például a transzspiráció, valamint a lipid- és fehérjetartalom kritikus szerepet játszanak a növények felvételében (Liu *et al.,* 2019). A növények SE felvételéhez kapcsolódó mechanizmusok sajnos még mindig nem tisztázottak. A növények gyökerei felszívják a szerves vegyi anyagokat és a xilémen keresztül eljuthatnak a növények többi részébe is (Chen *et al.,* 2020).

Számos tanulmány vizsgálta az exogén szteroid hormonok hatását a csírázásra és a növények fejlődésére. A burgonya gyökérnövekedését és gumónagyságát az ösztrogén (17β-E2) csökkentette, (Brown, 2006) míg a

kukorica palánták növekedését 10 mg/l koncentráció gátolta, de 0,1 mg/l stimulálta (Bowlin, 2014). A mungóbabban és csicseriborsóban E1 és 17β-E2 alacsony (0,1μM) koncentrációban fokozott csírázást és vegetatív növekedést mutatott, de nagy (60μM) koncentrációban gátolta a fejlődést (Guan és Roddick, 1988). Lencse esetében a 17β-E2 kezelés fokozott növekedést és jobb csírázási toleranciát eredményezett a kadmium és a réz stressz szempontjából (Chaoui és El Ferjani, 2013). A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) esetében azonban az E1, 17β-E2 és E3 természetes ösztrogének már 0,1 μM koncentrációban csökkentették a növények generatív részét (Janeczko *et al.*, 2003).

Megemlítendő, hogy a xenoösztrogének képesek interferálni azon fitoösztrogénekkel is, melyek szabályozzák a hüvelyes növények és azok gyökérgümőiben a növénnyel szimbiózisban élő nitrogéngyűjtő *Rhizobium* baktériumok közti jelátvitelt (Fox, 2004).

2.5. Az ösztrogének hatása a gerinctelenekre

A gerinctelenek endokrin rendszere nagyban különbözik a gerinces állatokétól. Legnagyobb hatással a tributil-ón (TBT) vegyületek vannak, melyeket elsősorban biocidként (csíraölő) és festékekben használnak. Az első nagyszabású TBT által okozott katasztrófát Franciaországban az Arcachon öbölben, 1980-ban észlelték. Az 1947 és 1980 közötti időszakban rengeteg TBT-t tartalmazó hajófestéket használtak fel a hajóiparban, amely nagyon hatékony algagátló (antifouling) tulajdonsággal rendelkezett. A probléma az volt, hogy ez az anyag bekerült a vízbe és így hosszan tartó (4-7 év) hatása miatt óriási károkat okozott az ottani ökoszisztémákban. Hirtelen lecsökkent az osztrigapopuláció, a fiatal példányok visszafejlődtek, és már 20 ng/l vízben mért koncentráció kagylóhéj elvékonyodást okozott. A francia kormány azonnal szabályozni

kezdte a TBT tartalmú algagátló hajófestékek felhasználását. A szabályozásnak köszönhetően idővel regenerálódásnak indult az osztrigapopuláció (Alzieu, 1986). Hormonális, ún. IMPOSEX (superIMPOsition of SEXual characteristics) hatást fejt ki, amely hatására a nőstény egyedek elsődleges nemi jellege átalakul. Egész populációk pusztulását okozták az ilyen szennyezések. Az Egyesült Államok nagyobb hajózási forgalmat bonyolító kikötőiben is megfigyelték az IMPOSEX jellegű elváltozásokat, elsőként egy elterjedt csiga, a *Nucella lapillus* esetében (Bryan *et al.,* 1986). A káros hatásokat nemcsak csigákon, de számos kagylón (*Mytilus edulis*) is észlelték, és meglepően alacsony 1 ng/l vízben mért koncentráció már káros hatásúnak bizonyult. A vízi ökoszisztémák számára extrém toxikus vegyületként tartják számon (Ruiz *et al.,* 1994; Jha *et al.,* 2000).

2.6. Az ösztrogének hatása a gerincesekre

2.6.1. Halakra gyakorolt hatás

Az EDC-knek számos halakra gyakorolt hatását megfigyelték már laboratóriumi körülmények között, de egyre több olyan tanulmány születik, melyek élővizekben vizsgálják az EDC-k hatásait a vízi élőlényekre. Az Egyesült Királyság, Németország, Franciaország, Norvégia, Kína és az Egyesült Államok számos folyójának élővilága ki van téve az EDC hatásoknak, melynek fő forrása a szennyvíztisztító telepekről kikerülő szennyvíz. Olyan vízi környezetekben, melyek befogadják a szennyvíztisztítás után visszamaradt vizet, több jelenséget is megfigyeltek, melyek az ösztrogének negatív hatásaira utalhatnak.

Több tanulmány is kimutatta, hogy a természetes és mesterséges ösztrogének emelkedett koncentrációja feminizálja a hímivarú halakat (Rose *et al.,* 2002), és indukálja a vitellogenin (VTG) termelését (Kidd *et*

al., 2007), miközben megváltoznak a reproduktív tulajdonságok (Van Donk *et al.,* 2015). A vitellogenin a vitellin nevű fehérjének a prekurzora, mely a halak, kétéltűek és tojásrakó állatok kezdeti egyedfejlődési szakaszában játszik fontos szerepet. A vitellogenin gén működését több hormon szabályozza, legerősebb a petefészek sejtjeiben termelődő 17β-E2, ezért a vitellogenin nagyon jó biomarker az ösztrogénhatású anyagok kimutatására (Hansen *et al.,* 1999; Tyler *et al.,* 1999).

Jobling és munkatársai (1998) arról számolnak be, hogy a vizekben található EDC-k összefüggésbe hozhatók a hím halak vitellogenin szintézisének stimulálásával és az interszexualitással. Korábban Sumpter (1995) kimutatta, hogy az EDC-k csökkentik a herék fejlődésének sebességét a nemi érés alatt álló pisztrángokban (Sumpter, 2005).

2.6.2. Madarakra gyakorolt hatás

A madarakban hasonlóan, mint az emlősökben az ösztrogének bioszintetizálódnak, főleg a nemi mirigyekben, de a nemi mirigyektől eltérő szövetekben is, mint például a bőrben, szívben, izmokban, májban, agyban, zsírszövetben, hasnyálmirigyben és a mellékvesékben. Az ösztrogének kulcsszerepet játszanak a neuroendokrin rendszer szabályozásában, az agyi axonok és dendritek differenciálódásában és növekedésének szabályozásában és a szaporodási viselkedés szabályozásában is (Niranjan *et al.,* 2019). A madarak ösztrogénszintjének a növelése csökkenti a termékenységet, rontja a hímek párzási magatartását, lelassítja a nőstények ivarérettségét, felhalmozódhat a felnőtt egyedek szöveteiben, valamint a tojásokban, ami negatívan befolyásolhatja az embriók fejlődését és a későbbi növekedést is (Ottinger *et al.,* 2005).

A túl magas ösztrogénszint megváltoztathatja a madarak viselkedését, gyakran növelve az agresszív viselkedés kockázatát, és csökkentheti az immunrendszer normális működését (Heimovics *et al.,* 2015). Az 1970-es években az Ontário-tónál az Ezüstsirály *(Herring gull)* reproduktív szerveinek fejlődési rendellenességeit találták embriókban és újonnan kikelt fiókákban. A hímeknek elnőiesedtek az ivarmirigyei, és a nőstényeknél petevezeték fejlődési rendellenességeket figyeltek meg (Fox.,1992). Fry és Toone (1981) ugyanezt a fejlődési rendellenességet írta le azoknál a dél-kaliforniai tengeri madaraknál, melyek tojásaiba DDT-t injektáltak.

2.6.3. Emlősökre gyakorolt hatás

Az EDC-k különféle hatással lehetnek az emlősök szervezetére. Leggyakrabban kölcsönhatásba lépnek nukleáris receptorokkal és aktiválják vagy elnyomják a célgének hatását (Aranda és Pascual, 2001). Az EDC-k kölcsönhatásba lépnek az általuk utánozott hormonokra specifikus hormonreceptorokkal. Például az ösztrogénutánzók, mint a biszfenol-A (BPA) és a dietil-sztilbösztrol (DES) úgy hatnak, hogy hatásukat elsősorban az ösztrogén receptor (ER) alfán keresztül gyakorolják, míg a BPA az (ER) béta révén is kifejtheti hatását (Rouiller-Fabre *et al.,* 2015).

Az EDC-k különböző nukleáris receptorokon keresztül is kifejthetik hatásukat, például a peroxiszóma-proliferátor-aktivált receptor (PPAR) család tagjai között, melyek jelen vannak a reproduktív szövetekben (Rouiller-Fabre *et al.,* 2014). Felnőtt egereken tesztelt ftalátok expozíciója a PPAR-alfa és a PPAR-gamma aktiválódását mutatta (Latini *et al.,* 2008). Figyelemre méltó, hogy az EDC-k nem feltétlenül csak a

hormonreceptorokhoz kötődnek, például a DDT ösztrogén agonista kategóriába tartozik, mivel az egyik metabolitja egy anti-androgén hatású vegyület (Kelce *et al.*, 1995).

Az ösztrogén hormonok létfontosságúak az emberi biológia és fiziológia szempontjából. Segítenek a reprodukció, a szív- és érrendszeri funkciók, a csontszilárdság, a kognitív viselkedés, a sikeres terhesség és a gasztrointesztinális rendszerek szabályozásában (Plotan *et al.*, 2014). Az ösztrogének elengedhetetlenek a normál humán fiziológiához, de komoly káros hatással lehetnek, ha a környezetben felhalmozódnak és belépnek az emberi táplálékláncba. Ha a biztonságos küszöbérték felett jutnak az emberi szervezetbe, növelhetik a rák kockázatát, szív- és érrendszeri megbetegedéseket indukálhatnak (Wocławek-Potocka *et al.*, 2013).

A humán mellrákból származó sejtvonalon (pl. MCF-7) végzett tesztekből kiderül, hogy az ösztrogének szupraoptimális szintje összefüggésben lehet a nők emlődaganatának növekedésével (Moore *et al.*, 1993) és a férfiaknál a prosztatarák kialakulásával (Coffey, 2001; Nelles *et al.*, 2011), bár az ok-okozati hatás erősen vitatott. Az ösztrogénaktivitással rendelkező BPA pajzsmirigyhormon antagonista, kimutatták, hogy kötődik a prosztata androgén receptorokhoz olyan férfiaknál, akik prosztata daganatban szenvednek (Zoeller *et al.*, 2012).

Az EDC-k jelenléte csökkent spermiumszámot, daganatos megbetegedéseket okozhat (Harrison *et al.*, 1997), több tanulmány is azt a tényt boncolgatja, hogy a jelenlegi expozíciós szintnél nincs bizonyíték arra, hogy az EDC-k káros hatással lennének az emberi egészségre (Sharpe és Skakkebaek, 1993), és mivel hosszú a betegségek kialakulásának az ideje, így nehéz azt bizonyítani (Cowin *et al.*, 2007). Továbbá előidézhetik a korai menopauzát, befolyásolhatják a reproduktív fejlődést és fiatal

nőknél is virilizációt okozhatnak. Számos tanulmány kimutatta, hogy az ösztrogének szerepet játszanak a hímivarsejtek spermaszámának csökkenésében és a férfiak feminizációjában (Jobling és Sumpter, 1993; Bolong *et al.*, 2009). Sajnos még mindig vitatott és nincs teljes egyetértés azzal kapcsolatban, hogy az EDC-k szerepet játszhatnak-e a felsorolt betegségek kialakulásában. Az EDC expozíció humán hatásainak tanulmányozásánál hátrányt jelent a betegségek hosszú látenciája (Cowin *et al.* 2007).

Sajnos a történelem során több konkrét eset is történt, mely során az EDC-k hatása emberi életeket követelt. Az egyik legismertebb eset a DES (dietilstilbösztrol) magzatvédővel kapcsolatos. A DES-t 1938-ban Charles Dodds biokémikus szintetizálta (Dodds *et al.,* 1938). Az 1940-es évektől egészen az 1970-es évek elejéig a DES-t amerikai és európai nők millióinak írták fel, kezdetben a menopauza tüneteinek kezelésére, később pedig a terhes nők vetélésének megelőzése érdekében. 1971-ben Herbst és munkatársai kimutatták, hogy hüvelyrákot okoz olyan fiatal nőknél, akiknek az édesanyjuk DES kezelést kapott. Azóta rengeteg DES jelentés született a szintetikus ösztrogén negatív hatásairól (Troisi *et al.,* 2017).

1954-ben a Chemie Grunenthal szintetizálta Nyugat-Németországban a talidomidot (α-ftálimidoglutarimid). Céljuk az volt, hogy peptidekből állítsanak elő alacsony költségű antibiotikumot. Mivel antibiotikumokat nem sikerült előállítaniuk, ezért megvizsgálták ennek az új molekulának az emberre gyakorolt nyugtató hatását (Swam *et al.,* 2005). Az állatkísérletek nem mutattak negatív hatást, így 1957-től forgalomba került és 46 országban értékesítették. A gyógyszer gyorsan sikeres lett, 1958-ban a vállalat minden német orvosnak levelet írt, hogy írják fel a talidomidot terhes nőknek reggeli rosszullét és hányinger esetén (Silverman 2002).

1961-ben kezdtek megjelenni olyan jelentések, amelyek a talidomidot különféle születési rendellenességekkel kapcsolták össze. Widukind Lenz német gyermekorvos megállapította, hogy a gyógyszer alkalmazása a terhesség 20. és 36. napja között magzati rendellenességeket okozhat. Jelenleg terhes nőknél már nem alkalmazzák a gyógyszert, de különféle immunrendszeri rendellenességek és rákbetegségeknél óriási sikerrel használják (Tempfer *et al.,* 2017; Aguiar *et al.,* 2017).

Egy hasonló eset történt 1968-ban Japánban, amikor a Kanemi cég által gyártott rizsolaj véletlenül PCB-kkel, poliklórozott dibenzofuránokkal (PCDF), poliklórozott kvaterfenilekkel szennyeződött (Onozuka *et al.,* 2009). Több mint 500-an haltak meg a szennyezett olajnak való kitettség következtében és több mint 1800 embernél jelentkeztek tünetek, mint például szabálytalan menstruációs ciklus, végtagzsibbadás, bőrpigmentáció és bőrelváltozások. Az incidenst Yusho olajbetegségként ismerik. 36 évvel később (2004) megmérték a Yusho betegek vérében az összes dioxin és 2,3,4,7,8-penta-klór-dibenzofurán szintjét és azt találták, hogy az értékek 3,4-4,8 és 11,6-16,8-szor magasabbak voltak, mint a kontroll alanyoknál. Ez is azt bizonyítja, hogy a PCB-k és a dioxinok hosszú ideig maradnak az élő szervezetekben (Furue *et al.,* 2005; Encarnacao *et al.,* 2019).

1979-ben hasonló eset történt Tajvanon, melyet Yu-Cheng incidensnek neveztek el, melyben 2000 ember fogyasztott PCB-kel és PCDF-el szennyezett rizsolajat. A tünetek hasonlóak voltak a Yusho áldozataihoz. A mortalitás itt is magas volt a kialakult májbetegségek miatt. A fertőzést szenvedett nők gyermekei ektodermális rendellenességekkel, viselkedési problémákkal születtek, visszamaradt fejlődésük, a kognitív fejlődés gyenge volt és jellemző volt a 2-es típusú

cukorbetegség is (Chen *et al.,* 1994; Fenichel és Chevalier 2017). Ezek a történelmi események felhívják a figyelemt arra, hogy a szabályozatlan szintetikus vegyszerek előállítása és használata drámai következményekkel lehet az emberi egészségre és a környezetünkre.

2.7. Az ösztrogénhatású vegyületek szabályozása

Mint sok más tudományterületen, a közvélemény EDC-kkel kapcsolatos szkepticizmusának egyik oka az ipar által támogatott lobbik befolyása. A jelenlegi jogszabályok és szabályozások sajnos nem hatékonyak az emberi egészség és a bolygó védelme szempontjából. A tendencia az volt, hogy az ipari vegyszerek többsége anélkül kerül a piacra, hogy alaposan tesztelték volna, és csak akkor szabályozzák vagy tiltják be azokat, ha bármilyen káros hatás drámaian nyilvánvaló.

Ezzel szemben a gyógyszereket intenzív és nagyon költséges tesztelési eljárásoknak vetik alá. Sokszor még ezután a folyamat után is előfordulhatnak másodlagos hatások, melyeket meg kell vitatni. Az ipari vegyszerek piacra dobását is, hasonlóképpen kellene megvitatni, nemcsak nemzeti szinten, hanem globális szinten is. A legtöbb EDC ubiqueter szennyezőnek minősül, a POP vegyületek például elpárolognak a melegebb vidékekről és képesek több ezer mérföldet is megtenni, a hidegebb területeken kicsapódni és ott szennyezést okozni, ahol sosem használtak hasonló anyagokat (UNEP, 2010). Több európai és nemzetközi környezetvédelmi szerződés létezik már az EDC-kről.

1999-ben az Európai Bizottság Toxicitási, Ökotoxicitási és Környezetvédelmi Tudományos Bizottsága (European Commission's Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment - CSTEE) és az Európai Parlament bemutatta az endokrin rendszer

megzavarására vonatkozó közösségi stratégiát, amelynek célja az emberek egészségének és a környezetünk megóvása (Commission documents, 1999).

2001. május 22-én Svédországban 152 nemzet írta alá az ENSZ Környezetvédelmi Programja keretén belül a POP-okról szóló nemzetközi szerződést. A Stockholmi Szerződés kimondja, hogy a POP-ok jelentős veszélyt jelentenek az emberek egészségére és a környezetre egyaránt.

Alapvető céljai, hogy a veszélyes POP vegyületeket felszámolják, biztonságos alternatívákat keressenek a POP vegyületek helyett, régi berendezések megtisztítása, melyek POP vegyületeket tartalmazhatnak, együttműködés a POP mentes jövőért (Stockholmi Egyezmény, 2001). A szerződés előírja a feleknek, hogy intézkedéseket tegyenek a POP-ok környezetbe való kibocsátásának megszüntetéséről vagy csökkentéséről. 12 anyaggal kezdődött, melyet „piszkos tucatnak" nevezünk. Ezek között nyolc klórozott peszticid (aldrin, dieldrin, endrin, mirex, klórdán, heptaklór, DDT és toxafén), két ipari vegyszer (PCB és HCB) és két melléktermék, a PCDF és poliklórozott dibenzo-p-dioxin) szerepelt. Az egyezmény 2004 május 17-én lépett hatályba és nemzetközi joggá vált. Az évek során további anyagokkal egészült ki, 2018-ban pedig már 182 szerződő fél írta alá (Stockholmi Szerződés kibővítés 2018).

További fontos nemzetközi megállapodások közé tartozik a Bázeli Nemzetközi Egyezmény és a Rotterdami Egyezmény, melyek globális szinten szabályozzák a vegyi anyagokat, peszticideket és a veszélyes hulladékokat. Az Európai Bizottság 2011/8/EU irányelve az elővigyázatosság elve alapján megtiltotta a cumisüvegek és élelmiszertároló dobozok gyártása során a BPA felhasználását (https://eur-

lex.europa.eu). Az Európai Unió 2011 óta korlátozza a BPA-t endokrin károsító tulajdonságai miatt. A BPA expozíció a tilalomnak köszönhetően jelentősen csökkent (Huang *et al.,* 2018). AZ EDC-ket a REACH-rendelet (1907/2006) is szabályozza, amely az emberi egészség és a környezet védelmét szolgálja a vegyi anyagok gyártásának és felhasználásának a szabályozásával.

További uniós jogszabályok közé tartozik a Víz-keretirányelv (2000/60/EK), az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet, a játékok biztonságáról szóló irányelv (2009/48/EK) és a kozmetikai termékekről szóló rendelet (1223/2009). A tudományosan megalapozott politikai döntések és az összehangolt nemzetközi erőfeszítések pozitív hatást gyakorolhatnak a környezetre és az emberi egészségre (Encarnacao *et al.,* 2019).

2.7.1. Az ösztrogénhatású vegyületek kitettségének minimalizálása

Az Endokrin Társaság, az Egészségügyi Világszervezet és az Egyesült Nemzetek Környezetvédelmi Programja a következő ajánlásokat tanácsolja az EDC-nek való kitettség minimalizálására (Wong *et al.,* 2017):

- Friss élelmiszerek fogyasztása a feldolgozott és konzerv élelmiszerek helyett (a csomagoló anyagok ugyanis komoly szennyeződési forrást jelentenek) (Lorber *et al.,* 2015).
- Célszerű a hozzáadott anyagot nem tartalmazó, vegyszermentes élelmiszereket választani (a bioélelmiszerek sokkal kisebb mértékben vannak kitéve a szennyeződéseknek).

- A műanyag edényeket ne használjuk mikrohullámú sütőben, ha tudjuk, cseréljük le azokat üvegre vagy kerámiára (a hőmérséklet emelkedésével a BPA kioldódhat az edényekből és bekerülhet az élelmiszerekbe) (Owczarek *et al.,* 2018).
- Csökkenteni kell a zsíros tej- és húskészítmények fogyasztását (a POP-ok a zsírszövetekben halmozódnak fel, melynek a koncentrációja a tápláléklánc végén lévő csúcsragadozóknál, mint például az embernél is elérheti maximális szintjét) (Valvi *et al.,* 2015).
- A kozmetikai termékek (sminkek, parfümök, bőrápolók) ne tartalmazzanak ftalátokat, parabéneket, triklozánt és más vegyi anyagokat sem (Valvi *et al.,* 2015).
- Célszerű bio háztartási tisztítószereket alkalmazni (a BPA, ftalátok, triklozán emberi expozíciója az élelmiszerek, a víz és a fogyasztási cikkek mellett a háztartási tisztítószereken keresztül történik (Valvi *et al.,* 2015).
- Kerülni kell az égésgátlóval kezelt bútorokat (széles körben használták a polibrómozott-difenil (bifenil)-éter), brómozott égésgátlóként, melyeket 2004-től fokozatosan kezdtek kivonni a forgalomból) (Miller *et al.,* 2009).
- Rendszeresen kell szellőztetni a belső környezetünket (életünk 90%-át zárt térben töltjük, becslések szerint pedig a beltéri környezet a fő forrása az EDC-knek) (Rudel *et al.,* 2010).
- Alternatívákat kell találni a műanyag játékokra (a gyermekjátékok és fogászati cikkek legtöbbször műanyagból készülnek, melyek ftalát-észtereket tartalmaznak. A gyerekek játék közben gyakran

közel teszik ezeket a játékokat a szájukhoz, mely elsődleges forrása lehet az EDC szennyezésnek) (Suzuki *et al.*, 2012).

2.8. Az ösztrogénhatású vegyületeket kimutató módszerek

A környezeti minták elemzése során komoly kihívást jelent az EDC vegyületek kémiai sokfélesége a nehézfémionoktól egészen a komplex szerves molekulákig (pl. kadmiumtól a szintetikus ösztrogénekig), továbbá a kimutatási határérték is rendkívül alacsony (1 ng/l). Mivel az EDC-k ng/l vagy µg/l szinten vannak a környezeti mátrixokban, ezért ezeket koncentrálni kell. A legtöbb esetben szilárd fázisú extrakciót (SPE) alkalmaznak (de Mes *et al.*, 2005). Ezek a minták általában több szerves vegyületet és szuszpendált szilárd részecskéket tartalmazhatnak, ezért az extrahálás előtt szűrési lépéseket kell végrehajtani, hogy elkerüljük az eltömődést, amikor SPE-n keresztül készítjük elő a mintáinkat.

Az EDC-k elemzése kémiai vagy biológiai technikákon alapul. Minden technikának megvan az előnye és a hátránya is. A kémiai technikák képesek a megcélzott ösztrogén vegyületek mennyiségének meghatározására. Az alkalmazáshoz főként a gázkromatográfiát (GC) vagy folyadékkromatográfiát (LC) használják. A GC azonban csak az illékony és termikusan stabil vegyületekre korlátozódik. A tömegspektrometriát (MS) lehet kombinálni GC és LC technikákkal, hogy nagyobb érzékenységet tudjanak elérni (Voulvoulis és Scrimshaw., 2003).

A biológiai módszerek közül alkalmazható az EDC-k vizsgálatára a kompetitív ligandumkötődési vizsgálat, ami egy olyan ösztrogénhatáson alapul, mely szerint az EDC-vegyületek a sejtmagban egy specifikus, nagy affinitású receptorhoz kötődnek. Ez a vizsgálat egyszerre határozza meg az agonisták és az antagonisták receptorhoz való kötődését, mely a

vizsgálat hátrányát is jelenti egyben, mivel nem tudja elkülöníteni az agonista és az antagonista hatásokat (de Mes *et al.,* 2005).

Mivel a kémiai sokféleség miatt lehetetlenség lenne valamennyi vegyület egyidejű analízise kémiai módszerekkel, ezért dolgozták ki az összhatást mérő (holisztikus eredményt nyújtó) biológiai módszereket (effect-based methods). Fontos ugyanakkor, hogy az analitikai módszerek teljesítményjellemzőinek segítségével minősíteni tudjuk, hogy az adott módszer milyen koncentrációtartományban működőképes, milyen a megbízhatósága, pontossága, precizitása stb.

A rekombináns receptor vizsgálatokhoz (*in vitro* génexpressziós vizsgálat) genetikailag módosított emlősejteket vagy élesztőtörzseket használnak. A humán mellrákból származó sejtvonallal (pl. MCF-7, T47D) végzett tesztek az ún. E-screen, a sejtosztódást vizsgálják. A teszt lényege, hogy a nőivarú egyedek szaporítószerveiben ösztrogénhatású anyagok hatására sejtosztódás kezdődik, nagyon alacsony (pg/l) koncentráció esetében is. A vizsgálati módszer alkalmazható felszíni vizekre, szennyvizekre, növényvédőszer-maradványok kimutatására gyümölcsökből és zöldségekből. A technika fő hátránya a sejtvonalak reprodukálhatóságával kapcsolatos (Isidori *et al.,* 2010; Schilro *et al.,* 2011; Voulvoulis és Scrimshaw, 2003; Solo *et al.,* 1995).

Hasonlóképpen működik az ER-CALUX (Estrogen receptor-mediated, chemical -activated luciferase reporter gene-expression), ahol a humán emlőrák sejtekből és a humán ösztrogén receptort kifejező sejtek ösztrogénhatásra luciferáz enzimet termelnek (Legler *et al.,* 2002). A sejtvonalaknál egyszerűbben kezelhető a YES teszt, mellyel részletesebben is foglalkozunk majd (Routledge *et al.,* 1996).

Az *in vitro* vizsgálatok mellett *in vivo* vizsgálatokat is kidolgoztak és alkalmaznak is az EDC-k meghatározására. Számos állat (ízeltlábúak, kétéltűek, halak, patkány, egér) esetében léteznek jól működő, az EDC-k kimutatására alkalmas tesztek. A gerinctelenek közül (pl.: földigiliszta (*Eisenia fetida/Eisenia andrei,* OECD 207, 1984, OECD 208, 2003), planária fajok *(Dugesia sp.)* (Pagán *et al.,* 2009), planktonikus kisrákokat (*Daphnia magna, Daphnia pulex, Ceriodaphnia dubia* (Adema, 1978; Versteeg *et al.,* 1997), gyümölcslegyeket (*Drosophila melanogaster,* Siddique *et al.,* 2005; Rand, 2010), szúnyogokat (pl. *Chironomus sp.,* OECD 218, 2004, OECD 219, 2004), puhatestűeket (pl.: *Potamopyrgus antipodarum,* Jobling *et al.,* 2004) használnak hormonhatás vizsgálatára. A vizsgálat lényege a reprodukciós rendszer változásain alapszik, ill. a kifejlett egyedek méretén, morfológiáján és biomarker géntermékek, mint például a vitellogenin termelésen (deFur 2004, Jobling *et al.,* 2004).

A halakat gyakran használják ezekben a vizsgálatokban. Az ösztrogén aktivitás értékelése a vitellogenin (VTG) szintézisének indukcióján alapul a tápközegben. A VTG a nőstény halak reprodukciós ciklusához kulcsfontosságú. A hím halakban nem található VTG, vagy csak nagyon alacsony koncentrációban. Viszont az ösztrogén expozíció a hím halakban indukálhatja a VTG termelődést (Sumpter és Jobling, 1995; Tyler *et al.,* 1996). Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy a hím halak VTG termelése jó biomarker a szennyvízminták ösztrogén aktivitásának meghatározása során (Jones *et al.,* 2000; Hennies *et al.,* 2003). A halmodellekből a közelmúltban számos biomarker transzgenikus vonalat is létrehoztak, amelyekben az állatok fő toxikológiai célszerveiben ösztrogén indukció hatására fluoreszcens fehérje termelődik. A fluoreszcens jel az állat elpusztítása nélkül *in vivo* leolvasható, ami alapján a vizsgált anyag által

előidézett morfológiai elváltozások, és az ösztrogénhatás erőssége is kimutatható (Kerdivel *et al.,* 2013).

Az ösztrogénhatás számszerűsítésére alkalmas módszer még az immunvizsgálat. Jelenleg a következő immunvizsgálati módszerek érhetőek el: az enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), a radio immunvizsgálat (Radioimmunoassay), vagy az enzimhez kapcsolt receptor vizsgálat (Enzyme Linked Receptor Assay). Ezek a technikák egy antigénnek egy szelektív ellenanyaggal történő reakcióján alapulnak. Előnye, hogy szinte bármilyen mátrixból lehetséges specifikusan, nagy érzékenységgel kimutatni az EDC-t. Hátránya, hogy általában egyetlen vegyület elemzésére alapulnak és minden új anyagnál létre kell hozni a megfelelő ellenanyagot, ami költséges folyamat (Huang *et al.,* 2001; Seifert *et al.,* 1999).

A vizsgálati lehetőségek közül a YES javasolt alkalmazható módszerként az ösztrogén aktivitás mérésére, mivel ez a legegyszerűbben elvégezhető, robusztus és olcsó módszer (Coldham *et al.,* 1997; Rutishauser *et al.,* 2004; Viganó *et al.,* 2008), melynek még a környezeti lábnyoma is alacsony.

2.9. A kutatásunk célja és hipotézisei

Ez a tanulmány Magyarországon, Pest megyében készült, mely az ösztrogénhatású anyagok megjelenését vizsgálja az intenzív szarvasmarhatartásban.

- Kutatásunk fő feladata az EDC-k megfigyelése és meghatározása volt egy intenzív tejelő szarvasmarhatelepen.
- Célunk volt megvizsgálni, hogy a szarvasmarhatelpen alkalmazott ivarzásindukáló készítmények ösztrogénhatásúak-e.
- Ezen célok eléréséhez az EDC-k elemzésére alkalmazható, validált *in vitro* módszerre volt szükségünk. Kész, kidolgozott módszer azonban nem állt rendelkezésre a szakirodalomban.
- A YES (élesztőteszt) alkalmazható volt a mintáink elemzésére, így elvégeztük annak a **módszerfejlesztését** és **validálását** hígtrágya, talaj és növénymintákra.
- Kutatásunkat az *in vitro* élesztő teszttel (YES) végeztük, melyet kiegészítettünk *in vivo* Zebradánió tesztekkel és analitikai mérésekkel, melyhez UHPLC-FLD módszert alkalmaztunk.
- Megvizsgáltuk, hogy a növénymintáink (az olaszperje (*Lolium multiflorum* L.), a kukorica (*Zea mays* L.)), talajok és a hígtrágya milyen mennyiségekben tartalmaznak ösztrogénhatású anyagokat.
- Meghatároztuk, hogy mely növényi részek és melyik fenofázisban halmozzák fel az ösztrogénhatású anyagokat.
- Megfigyeltük, hogy ugyanazon a területen jelentkezik-e tartamhatás a szervestrágyázást követően.
- Hogyan változik a talajok EDC tartalma a hígtrágya kijuttatások és a növények betakarítása között.
- Jelentkeznek-e rendellenességek a növényi kultúrák fejlődése során.
- Mindezt szántóföldi körülmények között vett mintákon végeztük.

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgált telep bemutatása

Elhelyezkedés: Pest megye

Átlag állatlétszám és fajta: 2300 db, ebből 1600 fejőstehén; 80%-ban Holstein-fríz, 15%-ban Magyar tarka és 5%-ban egyéb. Egy évben átlagosan 1500 ellés történik a telepen.

Technológia: A telepen félig mélyalmos, félig hígtrágyás kialakítású istállók találhatók. Az istállók etető előtti részét naponta háromszor megtisztítják a trágyától, mely a hígtrágya tároló medencébe kerül. Mivel nincs szeparátor, és jelentős a hígtrágya szárazanyagtartalma, ezért 4 db nagyteljesítményű keverő van a medencében, mely megakadályozza a kiülepedést.

A keverők a kijuttatás időszakában folyamatosan működnek, ha pedig nincs kijuttatás, akkor heti 4 alkalommal 12 órán keresztül keverik a medence tartalmát. Az istállótrágyát a telepen található trágyatárolókba gyűjtik, vagy közvetlenül a földterületekre juttaják ki az istállókból.

Telepen felhasznált anyagok:

- Az állatok gyógykezelésére gyulladáscsökkentőket és antibiotikumokat használnak;
- szaporodásbiológiai célból ivarzást indukáló és szinkronizáló készítményeket;
- a fejőház mosásához savas és lúgos vegyszereket;
- csülökápolás céljából felváltva savas és lúgos oldatokat használnak.

A telepen a kommunális szennyvizet, gázolajtartály körüli csapadékvizet, silóterek csurgalékát és az esővizet külön gyűjtik. Ezen kívül minden egyéb folyadék a hígtrágya medencébe kerül.

A tömegtakarmányokat a telep a saját területein megtermeli és betakarítja, az abrak takarmányt pedig különböző cégektől vásárolja.

A telepen alkalmazott szaporítási protokoll: A szarvasmarha-reprodukciót közvetett és közvetlen módon sokféle hormon szabályozza (Sammad *et al.,* 2019).

A tejhasznú szarvasmarha-állományokban egyre gyakoribb a fel nem ismert ivarzás, ezért célirányos tenyésztési programokat alkalmaznak. Ezeknek a programoknak az a lényege, hogy a hormonkezelések hatására ún. „vakon" lehessen termékenyíteni, naptári időponthoz kapcsolódóan. A kezeléseknél az ivari ciklusba kell hatékonyan beavatkozni, erre a tüszőfejlődés idején vagy a sárgatestfázisban van lehetőség. A ciklus szinkronizálására prosztaglandin-, progeszteron-, ösztrogén- és gonadotropin- (GnRH-) felszabadító hormonkészítmények alkalmasak. Európában az ösztrogénkezelés tiltott, a gesztagénkészítmények (szintetikus progeszteron, implantátumok) alkalmazása kissé bonyolult és drága, ezért a tüszőnövekedés és fejlődés befolyásolására elsősorban GnRH-készítményeket használnak (Gábor *et al.* 2004; Ricci *et al.,* 2020).

2017-ben és 2018 első félévében OvSynch protokollt alkalmazott a telep. Ez a program nevezhető a szaporodásbiológia alapprogramjának, melynek a lényege, hogy a 0. napon: 150 µg GnRH; 7. napon: 25 mg PGF; 9. napon: 150 µg GnRH injekciót kap a kezelésben részt vevő tehén, ennek köszönhetően a 10. napon vakon termékenyíthető.

2018 második felétől a dupla OvSynch protokollt vezették be, melynek során a tehén két OvSynch protokollon halad keresztül hét nap különbséggel és a második protokoll után történik a termékenyítés. Ez utóbbi esetben minden meghatározott időben történik, nincs szükség szubjektív döntésre az inszeminálás során, viszont precizitást igényel (Dirandeh *et al.*, 2015; Nowiczki *et al.*, 2017).

A vizsgált gyógyszerkészítmények leírása:

A tehenek tejtermelése ellés után indul meg, a sikeres tejtermeléshez tehát szükséges a sikeres vemhesülés is. Nagyüzemileg ezt intramuszkulárisan adott hormoninjekciók felhasználásával segítik elő és programozzák.

Kutatásunkban **5 különböző gyógyszert** vizsgáltunk, melyeket szaporodásbiológiai céllal használnak. Jellemző felhasználási területek az ivarzás és peteleválás (ovuláció) kiváltása és szinkronizálása, ellés megindítása, belső gyulladás (pyometra) kezelése stb. A vizsgálat során **6 különböző térfogatban** (**20µl; 10µl; 5µl; 1µl; 0,5µl; 0,1µl**) határoztuk meg a készítmények ösztrogénhatását (lásd a 6. táblázatban).

Ovarelin: tartalmaz 0,050 mg/ml D-Phe6-gonadorelint (diacetát-tetrahidrát formájában) és 15 mg/ml benzil-alkoholt (E1519). Gyártó: Ceva Sante Animale, Franciaország. Célállatfajok: szarvasmarha (tehén, üsző). Adagolása 2 mL készítmény/állat. Élelmezés-egészségügyi várakozási ideje (ÉVI) hús és tej esetében 0 nap.

Gonavet: tartalmaz 0,050 mg/ml D-Phe6-gonadorelint és 1 mg/ml klórkrezolt. Gyártó: Veyx-Pharma GmbH, Németország. Célállatfaj: szarvasmarha, sertés, ló. Adagolása 2 ml készítmény/szarvasmarha, ÉVI: 0 nap.

Alfaglandin: tartalmaz 0,250 mg/ml kloprosztenolt (kloprosztenol-nátrium formában), és 1 mg/ml klórkrezolt. Gyártó: Alfasan Nederland BV, Hollandia. Célállatfaj: szarvasmarha. Adagolása 2 ml készítmény állatonként. ÉVI: hús és egyéb ehető szövetek esetén 1 nap, tej esetén 0 nap.

PGF: tartalmaz 0,0875 mg/ml kloprosztenolt, (megfelel 0,092 mg/ml kloprosztenol-nátriumnak) és 1 mg/ml klórkrezolt. Gyártó: Veyx-Pharma GmbH, Németország. Célállatfaj: szarvasmarha, sertés. Adagolása üsző, tehén esetében 5,7 ml készítmény állatonként. ÉVI: ehető szövetek esetén 2 nap, tej esetén 0 óra.

Dinolytic: tartalmaz 5 mg/ml dinoproszt (dinoproszt-trometamin formában) és 16,5 mg/ml benzil-alkoholt. Gyártó: Zoetis Belgium SA, Belgium. Célállatfajta: ló, sertés és szarvasmarha. Adagolása 5 ml készítmény állatonként. ÉVI: hús és ehető szövetek esetén 1 nap, tej esetén 0 nap.

3.2. Mintavételi eljárások és a minták előkészítése

Hígtrágya:

4 évig negyedéves bontásban vizsgáltuk a hígtrágya folyékony és iszap részének az ösztrogéntartalmát.

Minden mintavétel alkalmával 4 db 50 ml-es centrifugacsövet merítéssel megtöltöttünk. A centrifugacsövek DNáz-, RNáz, endotoxin- és fémmentesek, -80°C-ig fagyaszthatók, vegyszereknek ellenállók. A mintavétel során kellően odafigyeltünk, hogy ne használjunk egyéb műanyag kellékeket. A centrifugacsöveket hűtőszekrénybe helyeztük, 8-10 °C-on tároltuk a vizsgálatokig.

Mintaelőkészítés:

A mintákat az ISO 19040 szabvány alapján készítettük elő, mely során szilárd fázisú extrakcióval vontuk ki az ösztrogénhatású anyagokat.

- Első lépésként az extraháló töltetet kondicionáltuk. Alkalmassá tettük a minta befogadására, ezért átfolyattunk 8 ml metanolt és 8 ml víz: metanol 95:5 keveréket. Ez lényegében egy megfelelő anyagi minőségű oldószerrel történő öblítést jelentett. Mivel általában vizes közegű minták extrakciójához használatos az SPE, a kondícionálás tipikusan metanollal hajtható végre.
- Második lépésként következett a minta felvitele, azaz 30 ml hígtrágyát átfolyattunk a szűrőoszlopon.
- Harmadik lépésként pedig a nemkívánatos szennyezőanyagok eltávolítására egy oldószeres öblítést iktattunk be, mely 10 ml víz: metanol 1:1 és 10 ml víz: aceton 2:1 –el történt. Egy-két percig levegőzni hagytuk a szűrő oszlopokat és utolsó lépésként egy megfelelő oldószerrel (metanol) leoldottuk a számunkra visszatartott komponenseket. 5 ml metanolt mértünk a szűrőoszlopokra, majd 1-2 percig állni hagytuk, s csak ez után engedtük végig a szűrőoszlopokon. A kapott oldat *készen állt az élesztőteszt elvégzésére*.

A centrifugálás után az iszapot légszárazra szírítottuk (30 °C-on 5 napig száradni hagytuk), majd 2g/10 ml-es metanolos oldatot készítettünk, melyet 30 °C-on 30 percen keresztül ultrahangos extrakcióval extraháltunk. Ezt követően 10 percig 4 °C-on lecentrifugáltuk és 5 ml-t pipettával átmértünk egy tiszta üvegkémcsőbe, melyet a további vizsgálatokig fagyasztóban tároltunk.

Istállótrágya:

Az istállótrágyát a vizsgált területek kezelése előtt gyűjtöttük be, majd a laborban homogenizáltuk és a hígtrágya iszap részéhez hasonlóan dolgoztuk fel és készítettük elő a további tesztelésre.

Talaj:

A talajmintákat a hígtrágya mintákhoz hasonlóan egyszer használatos 50 ml-es centrifugacsövekbe vettük. Mintavétel során a:

- növényminták közvetlen környezetéből,
- 5 pontból gyűjtöttük a mintákat,
- talajfelszíntől 30 cm mélységig

Mintaelőkészítés:

Az 5 pontból vett talajmintákat összekevertük, majd légszárazra szárítottuk. 5g/10 ml metanolos kivonatot készítettünk, melyet 30 °C-on ultrahangoztunk 30 percen keresztül. Ezután 10 percig 2000 fordulatszámon 4 °C-on centrifugáltuk. A tiszta felülúszókat a további vizsgálatokig fagyasztóban tároltuk.

Az olaszperje termesztési területéről származó talajmintákat külső laboratórium segítségével bevizsgáltattuk és elkészítettük az agrokémiai értékelését, melyet az 1. táblázatban láthatunk.

1. Táblázat: A kísérletben részt vett területek talajainak agrokémiai értékelése az olaszperje esetében

Megnevezés	**Tábla neve**	**Humusz m/m%**	**Kötöttség (KA)**	**pH (KCI)**	**Szénsavas mész m/m%**	**Foszfor mg/kg**	**Kálium mg/kg**
Labor eredmény	K1	3,34	38	7,93	38	118	265
Agrokémiai értékelés		jó	vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	közepes
Labor eredmény	K2	2,4	32	7,69	34	217	254
Agrokémiai értékelés		közepes	homokos vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	közepes
Labor eredmény	T3	1,34	32	7,5	4,4	273	130
Agrokémiai értékelés		gyenge	homokos vályog	gyengén lúgos	gyengén meszes	jó	közepes
Labor eredmény	T8	1,09	29	7,58	5,2	135	84
Agrokémiai értékelés		közepes	homok	gyengén lúgos	közepesen meszes	jó	gyenge
Labor eredmény	V2	2,3	39	7,6	32,5	215	341
Agrokémiai értékelés		közepes	vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	jó
Labor eredmény	V3	2,54	38	7,58	30,97	223	386
Agrokémiai értékelés		közepes	vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	jó
Labor eredmény	V4	1,58	28	7,6	22	196	137
Agrokémiai értékelés		gyenge	homok	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	jó
Labor eredmény	V5	2,86	35	7,57	11	190	222
Agrokémiai értékelés		jó	homokos vályog	gyengén lúgos	közepesen meszes	jó	közepes

A területek kijelölése során törekedtünk arra, hogy minél homogénebb parcellákat vonjunk be a kísérletekbe, ugyanis egyes értékmérő tulajdonságok befolyásolhatják a kísérlet menetét.

A kukorica termesztési területeiről szintén talajmintákat gyűjtöttünk, melyeket külső laboratóriumban vizsgáltattunk be.

2. Táblázat: A kísérletben részt vett területek talajainak agrokémiai értékelése a kukorica esetében

Megnevezés	**Tábla neve**	**Humusz m/m%**	**Kötöttség (KA)**	**pH (KCI)**	**Szénsavas mész m/m%**	**Foszfor mg/kg**	**Kálium mg/kg**
Labor eredmény	K3	2,85	37	7,4	23	227	336
Agrokémiai értékelés		jó	homokos vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	jó
Labor eredmény	K4	2,72	37	7,46	19,5	312	390
Agrokémiai értékelés		jó	homokos vályog	gyengén lúgos	közepesen meszes	igen jó	jó
Labor eredmény	T4	1,02	28	7,52	3,9	412	134
Agrokémiai értékelés		közepes	homok	gyengén lúgos	gyengén meszes	igen jó	jó
Labor eredmény	T5	0,92	28	7,49	4,1	77	45
Agrokémiai értékelés		igen gyenge	homok	gyengén lúgos	gyengén meszes	közepes	igen jó
Labor eredmény	V6	1,4	29	7,57	7,9	200	159
Agrokémiai értékelés		gyenge	homok	gyengén lúgos	közepesen meszes	jó	jó
Labor eredmény	V7	2,35	32	7,5	23,1	218	211
Agrokémiai értékelés		jó	homokos vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	igen jó	jó
Labor eredmény	V8	1,94	29	7,64	30,2	177	182
Agrokémiai értékelés		közepes	homok	gyengén lúgos	Erősen meszes	jó	jó
Labor eredmény	V9	3,4	36	7,79	32,9	185	268
Agrokémiai értékelés		jó	homokos vályog	gyengén lúgos	Erősen meszes	igen jó	közepes

A talajvizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy az egyes parcellák hasonló agrokémiai adottságúak voltak.

Növények:

A növénymintákat mindig a növények fejlettsége alapján vettük, melyet naptári időpontokhoz igazítottunk. A vizsgált területek egy időben voltak elvetve, így szinte azonos fejlettségi állapotban tudtuk mintázni azokat.

Az olaszperje esetében:

- 1. mintavétel: a vetést követő 49. nap,
- 2. mintavétel: a vetést követő 90. nap (a téli fagyok előtt),
- 3. mintavétel: a vetést követő 195. nap (a tavaszi műtrágyaszórás utáni 5. napon),
- 4. mintavétel: a vetést követő 257. nap (közvetlenül a betakarítás előtt).

Fém ásóval kiástuk a növényeket, majd a helyszínen eltávolítottuk a gyökerekről a földet és papírba csomagolva laborba szállítottuk.

A kukorica esetében:

- 1. mintavétel: a vetés utáni 14. nap,
- 2. mintavétel: a vetés utáni 34. nap,
- 3. mintavétel: a vetés utáni 80. nap (kultivátorozás és műtrágyázás utáni 5. napon),
- 4. mintavétel: a vetés után 126. nap (közvetlenül a betakarítás előtt).

Mintaelőkészítés:

A növénymintáinkat alapos tisztítás után gyökér és hajtás (levél és szár) részre különítettük el. Mindkét friss növényi részt egy kávédaráló segítségével homogenizáltuk, és légszárazra szárítottuk 30 °C-on 5 napig, napi háromszori átforgatással. 5g/10ml-es metanolos oldatot készítettünk, majd 30 °C-on ultrahangoztuk 30 percen keresztül a jobb feltárás érdekében. Ezután a metanolos növénymintákat egy centrifugacsőbe töltöttük és 10 percig 2000 fordulatszámon 4 °C-on centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót egy tiszta centrifugacsőbe tettük, melyet -20 °C-on fagyasztóban tároltunk a további vizsgálatokig.

3.3. *In vitro* élesztőteszt

Az ISO 19040-1:2018 szabvány szerint végeztük a vizsgálatainkat, mely a víz és szennyvíz ösztrogén potenciáljának meghatározására szolgál egy genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* BJ 3505 élesztő törzzsel. Vizsgálataink kezdetekor, 2017-ben, a szabvány még csak tervezetként létezett, szövegét később (2018) véglegesítették. Ez a módszer alkalmazható édesvizek, szennyvizek, vizes kivonatok, csurgalékvizek, üledékek eluátumai, pórusvizek, egyetlen anyag vagy vegyi keverékek vizes oldatai és ivóvíz vizsgálatára.

A kutatásunk fő módszere az élesztőteszt volt, ugyanakkor fontosnak tartottuk, hogy más módszereket is alkalmazzunk a mintáink ösztrogénhatásának a meghatározására. Ezért az *in vitro* élesztőteszt mellett, *in vivo* teszteket és analitikai méréseket is végeztünk.

Fogalmak és meghatározások:

Vizsgálatunk során a következő kifejezéseket és meghatározásokat használtuk:

- **vak sor:** ugyanolyan kezelésben részesülnek, mint a többi ismétlési sor, de nem tartalmaz teszt organizmust, azaz élesztőt.
- **oltóanyag:** az új kultúra megkezdéséhez használt mikroorganizmusok frakciója vagy exponenciálisan növekvő előtenyészet, friss tápközegben.
- **negatív kontroll:** desztillált víz
- **referenciavegyület**, pozitív kontroll: E2, mely által indukált válasz megfelelően reprodukálható és lehetővé teszi a mérési módszer kalibrálását
- **vizsgálati minta:** a vizsgálni kívánt minta, mely átesett az előkészítés lépésein.

3.3.1. Yeast Estrogen Screen (YES), élesztőteszt elve

A YES egy riportergén analízis, amelyet alkalmazhatunk a humán ösztrogénreceptor-alfa (hERα) aktiválódásának mérésére ösztrogén hatásokat kiváltó vegyületek jelenlétében. A hERα heterológ módon expresszálódik az élesztősejtben egy réz függő promoter irányítása alatt. Ha az ösztrogénreceptor agonistái belépnek az élesztősejtbe, akkor kötődnek az ösztrogénreceptor fehérjéhez, és így konformációs változást indukálnak. Ennek következtében két receptorfehérje egy receptor dimert képez, amely transzlokálódik a maghoz.

Az ösztrogénreceptor aktiválódását a β-galaktozidáz enzimet kódoló lacZ riporter gén indukciójával mérjük. A lacZ riporter gén egy ösztrogén receptor kötőhelyet (ERE) tartalmazó promoterhez kapcsolódik. Az ER dimer kötődik a promoterhez, és ezzel aktiválja a β-galaktozidáz termelését. A termelődött β-galaktozidáz enzim aktivitását alternatív, sárga színű szubsztrát (chlorophenolred-ß-D-galactopyranoside, CPRG)

segítségével mérjük, ugyanis ennek terméke piros, amelyet spektrofotométeren 580 nm-en mérhetünk.

A vizsgálat során az ISO 19040 szabványban leírtak alapján végeztük a vizsgálatainkat. A kutatásban részt vevő készülékeket az 1. számú melléklet tartalmazza. A reagenseket és a táptalajokban felhasznált anyagokat a Merck Kft-től vásároltuk, melyek a 2. számú mellékletben vannak feltüntetve. A gombatenyésztéshez használt tápoldatok pedig a 3. számú mellékletben találhatók.

3.3.2. Lemez beállítása

Vizsgálataink során a 96 lyukú Elisa lemezeket használtuk (3. ábra). A lemez minden esetben tartalmaz két pozitív, két negatív kontrollt, egy ún. „vak" sort és a mintáink különböző hígításait.Mindegyik lyukba 120 µl minta térfogatot töltöttünk. Adott hígítási szinteken 4 ismétlést állítottunk be.

YES Teszt 1. nap

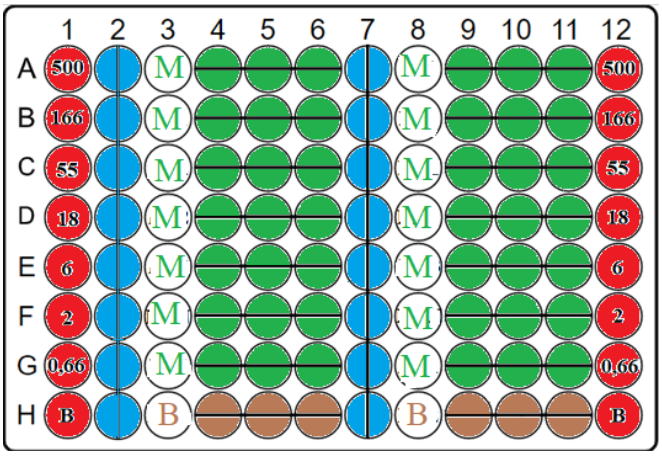
Steril körülmények között 5 ml növekedési tápoldathoz 350 µl gomba tenyészetet (*Saccharomyces cerevisiae* BJ 3505) adtunk. Az 50 ml-es centrifugacsőben elkészített tenyészetet alufóliával letakartuk és 22 óra ± 1 óra hosszat 30 °C ± 1 ° C hőmérsékleten állandó keverés közben inkubáltuk.

YES Teszt 2. nap

Alapos etanolos takarítás után (pipetták és munkafelületek), a vizsgálni kívánt mintákból kimértünk 10 µl-t négy ismétlésben minden egyes mintából. A vizsgálni kívánt mintákat mindig a 3-6 és 8-11 oszlopokba mértük. Miután a 10 µl kimért minta beszáradt a lemezen, 80 µl 0,3%-os etanolt adtunk hozzá.

A 2. és 7. oszlop a negatív kontroll, ezekbe csak MQ vizet (millipore, legfeljebb 5 µS/cm vezetőképességű víz) tettünk.

Az 1. és 12. oszlop a pozitív kontroll. 5 µg/l koncentrációjú 17β-E2 törzsoldatból kiindulva 500 ng/l és 0,66 ng/l közötti hígításokat készítettünk, melyet a 3. ábrán szemléltetünk.



3. Ábra: Az Elisa-lemez felépítése (1. és 12. oszlop – pozitív kontroll, 2. és 7. oszlop – negatív kontroll, 3-6 és 8-11 oszlopok – minták helye, H sor – vak sor)

Az első nap tenyésztésnek indított gombát 2500 rpm fordulatszámon 10 percig 30 °C-on centrifugáltuk. Centrifugálás után pipettával leszívtuk a felülúszót és a gombához körülbelül 7-8 ml tápoldatot adtunk, majd megmértük 620 nm-en az OD-ját, melynek 0,05 – 0,1 közöttinek kell lennie. Ezután rendszeres keverés mellett, hogy a gomba ne ülepedjen le, 40 µl-t mértünk a lemez összes sorára, kivéve a H sort, ugyanis az utolsó „vak” sorba nem kerül gomba.

Miután hozzáadtuk az élesztőgombát, lemértük 620 nm-en a sejtsűrűséget, hogy egyenletesen történt-e a kijuttatás. Ezután alufóliával letakarjuk a lemezt és 30 °C-on másnap reggelig inkubáltuk 22 ±1 órán keresztül. A 2. számú melléklet szemlélteti a 96 lyukú lemez felépítését.

YES Teszt 3. nap

Első lépésként pipettával szuszpendáltuk a mintákat és megmértük 620 nm-en a sejtsűrűséget, hogy lássuk az élesztő növekedésének mértékét. Ezután 30 µl-t átmértünk a tenyészetből egy új lemezre majd 50 µl LacZ reagenst adtunk minden egyes lyukba. A kész lemezt lemértük 580 nm hullámhosszúságon majd 1 órán keresztül inkubáltuk 30 °C-on. Az 1 óra elteltével ismét leolvastuk 580 nm-en a lemezt (színreakció).

3.3.3. Az élesztőteszt kiértékelés

A kapott adatok felhasználásával (kezdeti és kiindulási élesztőgomba sejtsűrűség, illetve színváltozás 580 nm-en) az alábbi értékeket számoltuk ki és elemeztük Excel táblázat és MyAssays Desktop szoftver segítségével.

- A relatív növekedés (620 nm), a minta lehetséges toxikus hatásainak felmérésére.
- Az átlagos korrigált abszorbancia (580 nm), melyet a későbbi statisztikai értékeléshez és a koncentráció-válasz görbe elkészítéséhez használtuk (Hong 2012).
- A standard görbe kalibrálását 4PL/5PL 4 vagy 5 paraméter logisztikus regresszió modellel (Finlay és Dillard 2007) végeztük. Az E2-ösztradiol-ekvivalensek (EEQ) meghatározásához a mintakivonatok korrigált abszorbanciáját interpoláltuk a megfelelő ösztradiol-standard görbe lineáris tartományában (Hong 2012). A

kapott EEQ koncentráció azt mutatja, hogy a minta ösztrogénaktivitása ekvivalens egy egyenlő koncentrációjú E2-oldat ösztrogén aktivitásával.

- Indukciós hányados: adott pozitív kontroll, illetve minta 580 nm-en mért középértékének és a hozzá tartozó negatív kontroll középértékének hányadosa.
- Mennyiségi meghatározás határa (LOQ): az E2 legalacsonyabb mennyisége, amely elfogadható pontossággal meghatározható.
- Kimutatási határ (LOD): a minta legalacsonyabb mennyisége, amely kimutatható, de mennyisége nem határozható meg pontosan.
- Legalacsonyabb hatástalan hígítás (LID): a legalacsonyabb hígítása a tesztanyagnak, amely nem mutat semmilyen hatást, vagyis nincs statisztikailag szignifikáns növekedés a riportergén aktivitásában a negatív kontrollhoz képest.

A korrigált abszorbanciát a következőképpen számoltuk:

$$A_C(i) = \frac{\left(A_{580}(i) - \bar{B}_{580}(i)\right)}{\left(A_{620}(i) - \bar{B}_{620}(i)\right)}$$

ahol,

A_c (i) = Korrigált abszorbancia az (i) vizsgálathoz (mintahígítások, referenciahígítások, negatív kontroll, pozitív kontroll).

A_{580} (i) = az abszorbancia 580 nm-en az (i) vizsgálathoz.

$\bar{B}_{580}$ (i) = az átlagos abszorbancia 580 nm-en az (i) vizsgálat vak mintái esetén

A_{620} (i) = az abszorbancia 620 nm-en az (i) vizsgálathoz.

$\bar{B}_{620}$ (i) = az átlagos abszorbancia 620 nm-en az (i) vizsgálat vak mintái esetén

3.3.4. Az élesztőteszt módszerfejlesztése és validálása hígtrágya, talaj és növényminták vizsgálatához

A módszer érvényesítése (validálása) azt a tevékenységet jelöli, amely során rendszerezett vizsgálatokkal bizonyítják, hogy az alkalmazni kívánt módszer teljesítményjellemzői kielégítik az analitikai módszerekkel szembeni követelményeket. A módszerfejlesztés az alábbi bioanalitikai paraméterek optimalizálását foglalja magába:

- referencia vegyületek (reference standards),
- kritikus reagensek (critical reagents),
- kalibrációs görbe (calibration curve),
- minőség ellenőrzési minták (quality control samples),
- szelektivitás és specificitás (selectivity and specificity),
- érzékenység (sensitivity),
- pontosság (accuracy),
- precizitás (precision),
- visszanyerés (recovery),
- az analit stabilitása a mátrixban (stability of the analyte in the matrix).

A **referencia vegyületek** tisztasága befolyásolhatja a vizsgálati adatokat, ezért ismert azonosítójú és tisztaságú, hitelesített analitikai referenciastandardokat kell használni. A **kritikus reagenseket** megfelelően jellemezni és dokumentálni kell. Ha a kritikus reagensekben változás történik, akkor újra optimalizálni kell a vizsgálatokat.

A módszer validálása után a **kalibrációs görbének** folyamatosnak és reprodukálhatónak kell lennie. A **minőség-ellenőrzések** segítségével lehet értékelni a vizsgálatok pontosságát, precizitását és a minták stabilitását. A

módszer szelektivitását rutinszerűen demonstrálják a több forrásból származó vakminták elemzései.

Validálás során meg kell győződni arról, hogy a vizsgálat mentes a potenciálisan zavaró anyagoktól. A módszer **érzékenységét** a mennyiségi meghatározás alsó határa, LOQ (limit of quantitation) határozza meg. A **pontosság** és **precizitás** értékelése a kvantifikációs tartományban a módszer fejlesztése során elengedhetetlen. A módszer precizitása a kölcsönösen független megismételt vizsgálatok eredményei közötti egyezés mértéke. Meghatározása megfelelő és megbízható referenciaanyag elemzésével történhet. Ha megfelelő referenciaanyag nem áll rendelkezésre, a helyesség becslése úgy is elvégezhető, hogy a mintához kémiai standard anyag ismert mennyiségét adjuk és meghatározzuk az addíció előtti és utáni analitikai válaszjel értékeket. A **visszanyerésnek** nem kell 100 százalékosnak lennie, de az analit és a belsőstandard visszanyerési mértékének következetesnek és reprodukálhatónak kell lennie.

Az élesztőteszt validálását 5 különböző közegben (desztilláltvíz, hígtrágya, talaj, növényi gyökér és hajtás) végeztük el. A teszt pontosságának meghatározására 6 különböző koncentrációt (2; 6,2; 18,6; 55,6; 166,5; 500 ng/l) használtunk az E2 standardból. A precizitás minden esetben meghaladta a 84%-ot, ami azt jelenti, hogy megfelel az Ipari Útmutató- Bioanalitikus Módszer Validálás (CDER és CVM, 2018) követelményeinek. A pontosság a két legkisebb koncentrációnál (2; 6,2) a MQ desztilláltvíz és a talajmintánk esetében nem érte el a 80%-ot. A többi esetben viszont 80% fölötti értéket kaptunk (3. táblázat).

A MQ víz validálása során a két legalacsonyabb hígításnál (2; 6,2 ng/l) nem értük el a 80%-os pontosságot, viszont a hígítási sor töményebb tagjainak esetében mindig 90% fölötti értékeket kaptunk. Mivel nem állt rendelkezésünkre olyan hígtrágyaminta, melynek az EEQ értéke nulla volt, ezért az 1200 ng/l EEQ értékű mintánkat használtuk a validálás során. A pontosság és a precizitás is minden esetben 96% feletti érték volt. A talajmintánk esetében a két legkisebb hígítás negatív eredményt mutatott, viszont a többi hígításnál 84% feletti értékeket értünk el.

A gyökér- és hajtásminták esetében sem állt rendelkezésünkre olyan minta, amely 0 EEQ értékkel rendelkezne. Ezért itt is azt a módszert alkalmaztuk, amelyet a hígtrágya esetében is. A gyökérmintánk EEQ értéke 1800 ng/l, míg a hajtás EEQ értéke 2000 ng/l volt. Ezekhez adtuk a kijelölt koncentrációkat és így határoztuk meg a precizitást és a pontosságot, mely minden esetben 91% felett volt. Az élesztőteszt mennyiségi meghatározásának legalacsonyabb értéke 1 ng/l 17β-E2, míg a kimutatási határ 27 pg/l volt.

3. Táblázat: A vizsgált közegek validálása során meghatározott pontosság és precizitás értéke

MQ víz

E2 koncentráció (ng/l)	*2*	*6,2*	*18,6*	*55,6*	*166,5*	*500*
SD	0,65	0,93	1,95	3,33	14,37	32,76
X	4,1	8,15	20,38	61,1	170,09	508,75
P%	84,15	88,59	90,43	94,55	91,55	93,56
A%	48,78	76,07	91,27	91,00	97,89	98,28

HÍGTRÁGYA

E2 koncentráció (ng/l)	*1202*	*1206*	*1218,6*	*1255,6*	*1366,5*	*1700*
SD	39	37	24	21	28	37
X	1240	1246	1235	1265	1391	1720
P%	96,85	97,03	98,06	98,34	97,99	97,85
A%	96,94	96,79	98,67	99,26	98,24	98,84

a hígtrágya EEQ értéke 1200 ng/l (SD=40) volt, ehhez adtuk a koncentrációkat

TALAJ

E2 koncentráció (ng/l)	*2*	*6,2*	*18,6*	*55,6*	*166,5*	*500*
SD	0	0	2,21	4,5	18	44,24
X	0	0	21,4	66,2	187	570
P%	0,00	0,00	89,67	93,20	90,37	92,24
A%	0,00	0,00	86,92	83,99	89,04	87,72

GYÖKÉR

E2 koncentráció (ng/l)	*1802*	*1806,2*	*1818,6*	*1855,6*	*1966,5*	*2300*
SD	94	97	137	58	70	114
X	1897	1899	1941	1874	2015	2425
P%	95,04	94,89	92,94	96,91	96,53	95,30
A%	94,99	95,11	93,69	99,02	97,59	94,85

a gyökér EEQ értéke 1800 ng/l (SD=155) volt, ehhez adtuk a koncentrációkat

LEVÉL-SZÁR

E2 koncentráció (ng/l)	*2002*	*2006,2*	*2018,6*	*2055,6*	*2166,5*	*2500*
SD	145	115	157	78	50	120
X	2180	2195	2214	2140	2210	2635
P%	93,35	94,76	92,91	96,36	97,74	95,45
A%	91,83	91,40	91,17	96,06	98,03	94,88

a levél-szár EEQ értéke 2000 ng/l (SD=170) volt, ehhez adtuk a koncentrációkat

A YES teszt módszerfejlesztésének és validálásának tehát az a jelentősége, hogy egy mind hazai, mind nemzetközi szinten egyedülálló módszert ad a tudomány kezébe, amellyel az egyedi vegyületek vizsgálatára alkalmas analitikai módszerek (pl. UHPLC) komplementereként össz-ösztrogénhatást tudunk mérni, mely környezeti, biológiai és humán oldalról nézve relevánsabb.

3.4. *In vivo* Zebradánió teszt

A Zebradánió a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet által javasolt toxikológiai modellnek számít, mely kis termetű, rövid generációs idővel és nagy mennyiségű ivartermékkel rendelkezik.

3.4.1. Mintaelőkészítés mikroinjektáláshoz

A minták eredetileg metanolos oldatban voltak, melyekből 1 ml-t automata pipettával átmértünk 1,5 ml-es centrifugacsövekbe (Eppendorf AG, Németország). A metanolt centrifugális bepárlóval (Eppendorf Concentrator Plus Complete; Eppendorf AG, Németország) távolítottuk el a csövekből 60 °C-on 60 percig, ugyanis Bart és Kyaw (2003) szerint a metanol magas mortalitást okoz a zebradánió embrióknál (Bart és Kyaw, 2003). A száraz anyagot 500 µl DMSO-ban (dimetil-szulfoxid), (Sigma-Aldrich, Magyarország) Vortex-szel (VWR International Ltd., Magyarország) 20 percig reszuszpendáltuk. A mintákat -20 °C-on tároltuk a mikroinjektálásig.

3.4.2. A Tg (vtg1: mCherry) biomarker zebrahal vonal jellemzése

A kísérletekhez használt zebradánió vonal egy vitellogenin riporter transzgénikus zebradánió vonal volt. A Tg(*vtg1*:mCherry) kifejlesztéséhez használt transzgénkonstrukció egy hosszú (3,4 kbp) természetes

vitellogenin-1 promóter szekvenciát tartalmazott, nagyszámú ERE (ösztrogénre reagáló elem) hellyel. Az mCherry riporter az endogén vitellogeninhez hasonlóan csak a májban termelődik. A vonal embrióinak érzékenységét és használhatóságát számos ösztrogén vegyületen, valamint környezeti mintákon tesztelték (Bakos *et al.,* 2019).

3.4.3. Zebradánió szaporítás és petegyűjtés

A laboratóriumi tenyésztésű Tg(*vtg1*: mCherry) zebradániókat Tecniplast ZebTEC recirkulációs rendszerben (Tecniplast S.p.s., Olaszország) 25,5 ± 0,5 °C-on (rendszervíz: pH 7,0 ± 0,2, vezetőképesség 550 ± 50 µS/cm) és 14:10 órás fény:sötét ciklusban tartottuk. A halakat naponta kétszer etettük száraz granulált táppal (Zebrafeed 400-600 µm, Sparos Lda., Portugália), melyet hetente kétszer frissen kikelt élő sórákkal (*Artemia salina)* egészítettünk ki. A halakat a kísérlet előtti napon késő délután tenyésztartályokba (Tecniplast S.p.a) helyeztük és másnap reggel eltávolítottuk az elválasztó falakat, így a halak ívni tudtak. Az összegyűjtött petéket Petri-csészékben (átmérő: 10 cm, JET Biofil, Kína), rendszervízben (25,5 °C ±1 °C) inkubáltuk 14:10 óra fény:sötét ciklusban 72 órán keresztül. 24 óra elteltével a nem megtermékenyített ikrákat és a rendellenes fejlődésű embriókat kiszelektáltuk.

3.4.4. Mikroinjektálás

A háromnapos lárvákat 60 -as csoportokban Petri csészékbe (átmérő: 6 cm, JET Biofil, Kína) helyeztük. A felesleges folyadékot műanyag pipettával eltávolítottuk, majd a csészéket 0,02%-os MS-222 (Tricane-methane-sulfonate; Sigma Aldrich; St. Louis, MO, US) érzéstelenítő oldattal töltöttük meg. A mikroinjektáláshoz érzéstelenítőt is tartalmazó agar lemezeket öntöttünk (1,5 g agar (Sigma Aldrich,

Magyarország) 100 ml 0,02%-os MS-222-ben) amelyekbe egy öntőforma segítségével speciális vájatokat készítettünk (Eppendorf AG, Németország). Az érzéstelenített lárvákat az agar lemezre helyeztük, amelyet érzéstelenítő oldattal töltöttünk meg.

A lárvákat vágott végű Microloader pipettavéggel (Eppendorf, Németország) bal oldalra orientáltuk. Az injektáló kapillárist megtöltöttük a mintáinkkal és a mikroinjektáló manipulátorba helyeztük (microINJEKTOR MINJ 2, TriTech Research Inc. USA). A megfelelő injektált dózis meghatározásához a V3 folyadékfázisú (DMSO-ban) mintánkat választottuk ki, melyből 3 dózist (cseppátmérőt (térfogatot)): 50 µm (0,074 nl), 125 µm (1,02 nl) és 200 µm (4,17 nl) injektáltunk. Az optimális kezelési idő meghatározásához 3000 ng/l-es 17β-E2 oldatot használtunk, amelyet 0,074 nl dózisban injektáltunk a lárvák szikhólyagjába.

A mikroinjektálás után a lárvákat 20 fős csoportokban, három ismétlésben Petri-csészékbe (átmérő: 6 cm, JET Biofil, Kína) tartottuk. Az érzéstelenítő oldatot eltávolítottuk, és rendszervizet töltöttünk a helyére. A lárvákat 25,5 °C-on (±1 °C) inkubáltuk 14:10 óra világos:sötét ciklusban 96 órán keresztül. A megfelelő injektált dózis meghatározásához négy napon keresztül naponta ellenőriztük a beoltott lárvák mortalitását.

3.4.5. Szemrevételezés, elemzés

Az optimális kezelési idő meghatározásához a fluoreszcens jelek megjelenését szemrevételezéssel ellenőriztük napi szinten, négy napon keresztül az injektált lárvákban. A főteszt elemzései Csenki és munkatársai leírása alapján készültek (Csenki *et al.,* 2020), az alábbiak szerint: A hét napos lárvákról műanyag pipettával eltávolítottuk a rendszervizet, és

0,02%-os MS-222-sel (Sigma- Aldrich, USA) bódítottuk őket. Az érzéstelenített embriókat metil-cellulózba helyeztük, bal oldalra orientáltuk, és egy levágott végű Microloader pipettavéggel (Eppendorf AG, Németország) a cellulóz aljára nyomtuk.

Fluoreszcens sztereomikroszkóp alatt (Leica M205 FA fluoreszcens sztereomikroszkóp, Leica DFC 700T kamera 700T kamera) Bright Field (exponálási idő: 6 msec, nagyítás: 60x) és fluoreszcens (mCherry szűrő, expozíciós idő: 2 s, nagyítás: 60x) képeket készítettünk a lárvákról Leica Application Suite X, Leica Microsystems GmbH, Németország). Az RGB (Red, Green, Blue) színtartomány vörös tartományába eső jeleket az ImageJ szoftver (Schneider *et al.,* 2012) értékelte ki az elkészített fluoreszcens képek alapján. Minden képen kiválasztottunk egy azonos méretű elliptikus területet, amelyet a máj területére mozgattunk, majd meghatároztuk a jelerősséget és az érintett terület méretét. Az integrált sűrűség (ID) értéket a szoftver automatikusan kiszámolta (Csenki *et al.,* 2020). A fő tesztnél az ID-t az injektálás után 96 órával határoztuk meg.

3.4.6. Mikroinjektálási módszer optimalizálása

A kísérlet tervezésekor több tényezőt is figyelembe kellett vennünk. Mivel a minták zebradánió embriókon történő tesztelésének elsődleges célja az ösztrogén aktivitás kimutatása volt, olyan kísérleti beállítást kellett találni, ahol a beadott minták mennyisége nem okoz döntő szervi károsodást az egyedekben, de elegendő ösztrogén anyagot tartalmaz a fluoreszcens hatás kiváltásához a májban, az akut kezelés során. Az ösztrogén hatások kimutatására alkalmas transzgénikus halvonalak közül, mint a Tg(vtg1: mCherry), elsősorban a hímek és az embriók alkalmasak

az ösztrogén hatások kimutatására, de az embrióknak több előnye is van, ezért a vizsgálatokat embriókon végeztük. A zebradániómáj – ahol a vitellogenin is termelődik – a megtermékenyítés után 6 órával (6 hpf-hours past fertilization) kezd fejlődni, és 50 óra után (50 hpf) kezd működni (Ober *et al.,* 2003; Tao és Peng, 2009).

Az ösztrogén anyagok hatására a máj az embrió 2-3 napos korától képes endogén vitellogenint termelni (Chen *et al.,* 2010). Az endogén vitellogeninhez hasonlóan és párhuzamosan/szinkronban az mCherry riporter csak a májban expresszálódik, ahol az első erősebb fluoreszcens jelek 72 órás korban észlelhetők az embriókban, majd a jelerősség és a fluoreszcens méret területe a máj fejlődésével növekszik, megkönnyítve ezzel a vizsgálatok értékelését (Bakos *et al.,* 2019). A máj mérete és érettsége mellett a máj szerkezeti integritása is befolyásolja a fluoreszcens jel intenzitását és a terület méretét. Az embriók sejtjeit, így azok májsejtjeit is károsíthatja a mérgező anyagok magasabb koncentrációja (Bakos *et al.,* 2013; 2019). Ebben az esetben a vitellogenin termelés indukciója erősen csökkent, ahogy az összetett mintáink esetében várható volt, így ezt figyelembe kellett venni a kísérletek tervezésénél. Emellett az embriók jelentős egyéni érzékenységgel is rendelkeznek, amit a kísérleti egyedszámok meghatározásakor is figyelembe kell venni (Csenki *et al.,* 2020).

A mikroinjektálás egy egyszerű módja a vizsgálati anyagok halembriókba való anyagok bejuttatásának, korábban poláris és nem poláris anyagok vizsgálatára is használták, és megfelelő beállítás mellett a módszer képes fenntartani a beinjektált dózist. A mikroinjektálás jó alternatíva a magas szervesanyag-tartalmú minták vizsgálatára is, mivel

használatával a klasszikus módszerek során fellépő hipoxia (oxigénhiányos állapot) okozta másodlagos tünetek megjelenése is elkerülhető (Csenki *et al.,* 2019; Schubert *et al.,* 2014). Bár a halak már az injektálást követően is nagyon gyorsan és jól láthatóan reagálnak az anyagokra (Schubert *et al.,* 2014), az anyag eloszlása a szikben nem mindig egyenletes, így a bevitt anyag teljes felszívódásában csak akkor lehetünk biztosak, ha a szik teljes mennyisége felszívódik az embrriókból. Ez zebradánió esetében 165 ± 12 hpf-nél (termékenyítéstől eltelt órák száma) történik (Litvak és Jardine, 2003). A mintakoncentráció során az eredetileg használt acetont DMSO-ra cseréltük, mert irodalmi adatok alapján a fejlettebb embriók jobban tolerálják ezt az oldószert (Maes *et al.,* 2012).

Ezeket a kezeléseket minden vizsgált mintán elvégeztük, majd további kísérletekhez használtuk fel őket. A vizsgálat során 3 különböző térfogatú V3 mintát fecskendeztünk 3 napos embriók sárgájába/szikzacskójába. A 0,074 nl-es (cseppátmérő: 50 µm), az 1,02 nl-es (125 µm) és a 4,17 nl-es (200 µm). A V3 jelű mintákat három injektált térfogattal kezeltük, majd 4 napon keresztül vizsgáltuk a mortalitást. Az első két napon nem volt különbség a kezelések halálozási eredményei között. Az injektálás után 72 órával azonban a mortalitási adatok (0,074 és 1,02 nl $p<0,05$; 0,074 és 4,17 nl $p<0,01$; 1,02 és 4,17 nl $p<0,01$) már szignifikánsan elkülöníthetőek voltak. Az injektálás utáni negyedik napon a legkisebb injektálásban részesült egyedek között lényegében még mindig nem volt pusztulás. Az 1,02 nl-es kezelés esetén az embriók fele (51,67 (± 7,64%)) maradt életben, míg a legnagyobb injektált dózisnál az egyedek 28,67%-a (±5,51%) volt életben. Nem fordult elő mortalitás a kontroll és a nem injektált egyedek között.

Az eredmények alapján a mintákat később a legkisebb vizsgált térfogattal, 0,074 nl-rel fecskendeztük be. Az expozíciós idő hosszát az élesztőtesztben az eredeti, nem koncentrált mintákból számított hozzávetőlegesen átlagos ösztrogén-egyenérték (3000 ng/l E2) felhasználásával határoztuk meg, amelyet a legkisebb mennyiségben (0,074 nl) 3 napos embriókba fecskendeztünk). A fluoreszcens jelet mutató egyedek számát a kezelést követő 4 napon keresztül naponta ellenőriztük. Az eredményekből világosan látható, hogy a fluoreszcens jelet tartalmazó embriók száma folyamatosan nőtt az injektálás óta eltelt idő alatt. Bár még mindig nagyon alacsony arányban, a kezelés után már 24 órával voltak olyan embriók, amelyekben már fluoreszcens jelet lehetett megfigyelni a májban (3,3% (±2,89%)).

A fluoreszcens embriók számának szignifikáns növekedése először 72 órával az injektálás után következett be, ekkorra az embriók 38,3%-a (±5,7%) termelt fluoreszcens fehérjét. A 96 órás vizsgálati időszak utolsó napján az előző napi érték megduplázódott 80,4%-ra (±10,2%), így az eredmények alapján a további kísérletekben ezt az időpontot választottuk az injektálás utáni expozíciók végére. (A módszer részletes leírása megtalálható a Csenki *et al*., (2022) cikkében.)

3.5. Analitikai tesztek (UHPLC-FLD)

Az ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) egy elválasztási technika, mely a vizsgált anyag két egymással nem elegyedő fázis közötti megoszlási különbözőségén alapul. A kromatográfiás körülmények (kolonna töltetanyaga, eluens minősége stb.) megfelelő megválasztásával szinte minden vegyületcsalád és minta vizsgálatára alkalmas.

3.5.1. Mintaelőkészítés

Mintáinkból körülbelül 6-8 ml állt rendelkezésünkre, metanolos oldat formájában. Az UHPLC méréseknél nagy jelentősége van annak, hogy az oldószerek és az injektált minták is mentesek legyenek mindenfajta lebegő szennyeződéstől. Ezt úgy érhetjük el, ha az oldószereket és a mintáinkat is megfelelően kis pórusméretű szűrőn, ún. membránszűrőn átszűrjük. 10 ml-es fecskendőbe felszívtuk a mintáinkat, majd 4-5 ml-t átengedtünk a 0,45 mm-es üvegszűrőn (Chromafil® GF/PET-45/25), ezzel telítettük a membránt, majd 0,5-1 ml-t üvegcsébe engedtünk, melyek készen álltak a mérések elvégzésére.

3.5.2. Az analitikai módszer leírása

Az ösztrogének és a gyógyszerhatóanyagok koncentrációját fluoreszcens (FLD) és diódasoros detektorral (PDA) kapcsolt UHPLC-vel mértük (Shimadzu Nexera X2 LC-30AD). Az elválasztáshoz fordított fázisú Kinetex C18; 2,6 µm-os oszlopot használtunk (150 mm). A vizsgálandó hatóanyagokat 280 nm gerjesztési hullámhosszú és 310 nm emissziós hullámhosszúságú fluoreszcencia detektor alkalmazásával detektáltuk. A mozgófázis 57-43% -os ultratiszta víz (10 mM H_3PO_4 -val savanyított) és acetonitril keveréke volt. Az áramlási sebességet 0,8

ml/perc értékre állítottuk be, 40 ° C-on. A minták injektálási térfogata 1 µl volt. A műszerre vonatkozó kimutatási határt (LOD) és meghatározási határt (LOQ) a 4. táblázat tartalmazza.

3.5.3. Vegyszerek

Az analitikai tisztaságú standard vegyületeket a Sigma Aldrichtól vásároltuk. Az oldatok készítéséhez a laboratóriumban előállított ultratiszta vizet használtuk (0,055 µS/cm, LaboStar® PRO TWF).

3.6. Toxikológiai tesztek

A hígtrágya kijuttatása során előfordulhat, hogy negatív hatással van a közvetlen környezetére. Ezeket a negatív hatásokat ökotoxikológiai tesztekkel tudjuk igazolni. Vizsgálatunk során 4 tesztszervezetet (baktériumokat, növényi magvakat, algát és kisrákféléket) választottunk ki. A szárazföldi és vízi élőlényekre különböző hatással lehet a hígtrágya, ezért kiértékelésük során külön vizsgálati rendszereket alkalmaztunk.

Minden toxikológiai tesztet hígítatlan, 10x, 50x, 100x, és 500x-os hígítással végeztünk. A toxikológiai vizsgálatokhoz csak a nyári időszakból származó mintákat gyűjtöttünk, ugyanis ebben az időszakban juttatják ki a hígtrágya legnagyobb mennyiségét a szántóföldekre.

4. Táblázat: UHPLC mérési paraméterek

	Áramlási sebesség (ml/perc)	Víz/ Acetonitril (%)	Oszlop hőmérséklet (°C)	Kapacitási tényező (k')	UV λ (nm)	Fluoreszcens λ (nm)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
E3	0,7	57/43	40	2,7	-	Ex:280 Em:310	1,7	5
EE2	0,6	57/43	40	2,9	-	Ex:280 Em:310	2,27	6,89
E2	0,7	57/43	40	2,6	-	Ex:280 Em:310	1,4	4,3
E1	0,7	57/43	40	2,7	-	Ex:280 Em:310	1,6	4,9
D-Phe6-gonadorelin	0,8	57/43	40	2,5	-	Ex:280 Em:310	15,5	26,5
Kloprosztenol	0,8	57/43	40	2,5	-	Ex:280 Em:310	15,7	27,1
Dinoproszt-trometamin	0,8	57/43	40	2,5	-	Ex:280 Em:310	16,2	28,3
Klórkrezol	0,8	57/43	40	2,5	-	Ex:280 Em:310	15,9	27,3
Benzil-alkohol	0,8	57/43	40	2,5	-	Ex:280 Em:310	15,6	25,7

Meghatároztuk a vizsgált minták ösztrogéntartalmát (EEQ) is, élesztőteszttel, a fent megnevezett szabvány szerint. A hígtrágya folyékony és szilárd fázisainak elkülönítésére laboratóriumban a centrifuga, a termelésben a szeparátor szolgál. Utóbbi eszköz képes a szárazanyag-tartalmat, mintegy 95%-kal csökkenteni. Mivel az EDC vegyületek a szilárd szemcsékhez jobban kötődnek, így egy alacsony EEQ értékű, de nagy térfogatú „locsolóvizet”, és egy földnedves állagú, EDC vegyületekre és tápanyagokra nézve koncentráltabb szilárd fázist kapunk.

Sajnos a hígtrágyába azok az anyagok, gyógyszerek is bekerülnek, amelyeket a telep napi szinten felhasznál az állategészségügy területén. Például: gyulladáscsökkentő szerek, mint a marbofloxacin (1700 mg havonta), ketoprofén (2300 mg havonta), prednizolon (200 mg havonta), antibiotikumok - tőgyinfúziók, ampicillin (2500 mg havonta), kloxacillin (200 mg havonta)), cefquinom (100 mg havonta), novobiocin (150 mg havonta), benzilpenicillin-prokain (100 mg havonta), dihidrosztreptomicin (100 mg havonta), neomicin (150 mg havonta), ceftiofur (6000 mg havonta) oxitetraciklin (12 000 mg havonta) és ivarzás indukáló és szinkronizáló termékek, mint a kloprosztenol (22 mg havonta), prosztaglandin F2 alfa (7100 mg havonta), D-Phe6-gonadorelin (180 mg havonta). Továbbá rendszeresen használtak a vizsgált gazdaságban különböző vegyszereket, mint pl. (30-32% sósav, 200 l/hó, 20% foszforsav, 100 l/hó, 15% nátrium-hipoklorit, 500 l/hó).

3.6.1. *Azotobacter agile* és *Pseudomonas fluoreszcens* talaj toxicitási tesztek

Vizsgálataink során az MSZ21978-30:1988 Veszélyes hulladékok vizsgálata (*Azotobacter agile)* és MSZ21470-88:1993 Környezetvédelmi talajvizsgálatok (*Pseudomonas fluorescens)* talajtoxicitási teszteket alkalmaztuk.

Az *Azotobacter agile* és a *Pseudomonas fluoreszcens* tesztszervezetek szennyeződésre érzékeny talajbaktériumok (Gruiz *et al.*, 2001). Ezek a baktériumok képesek megkötni a molekuláris nitrogént, ezáltal növelik a talaj termékenységét és serkentik a növények növekedését. Az *Azotobacter* fajokat széles körben használják a mezőgazdaságban, különösen nitrogéntartalmú biotrágyákban (Neeru 2000). A *Pseudomonas fluoreszcens* kommenzális rizoszféra baktérium, amely segíti a növényeket a kulcsfontosságú tápanyagok elérésében, lebontja a szennyező anyagokat és elnyomja a kórokozókat az antibiotikum-termelés révén. A növények tápanyagot biztosítanak ezeknek az élőlényeknek, és megóvják őket a stresszes környezettől (Paulsen *et al.*, 2005).

A vizsgálatokhoz hígítási sorokat készítettünk (2x, 5x, 10x, 25x, 50x, 100x). A vizsgálatokat mikrotitráló lemezeken végeztük három ismétléssel, amely minden mélyedése 0,2 cm^3 módosított Fjodor Durov táptalajt és trifenil-tetrazolium-kloridot tartalmazott. Pozitív (10 mg/l Cu-oldat) és negatív (nagy tisztaságú víz, „Herco”) kontroll lemezeket is beállítottunk a teszt során. A mintákat 48 órán át 28 °C-on inkubáltuk (Pol_Eko_Aparatura 4.81 Incubator). A szaporodást vörös szín megjelenése kíséri, amely a táptalajhoz adott trifenil-tetrazolium-klorid dehidrogenázenzim jelenlétében redukálódott formájától, a trifenil-

tetrazolium-formazántól származik. Toxikus anyagok jelenlétében a táptalaj elszíneződésének mértéke a szaporodás gátlásával arányosan csökken. A piros a növekedési gátlás hiányát (+), a halvány piros a közepes növekedési gátlást (±), a színtelen pedig a teljes növekedésgátlást (-) jelzi.

3.6.2. *Daphnia* akut immobilizációs teszt

A *Daphnia magna* Straus 24 óránál fiatalabb egyedei érzékenyek a környezeti változásokra, például a vegyszerekre is. A frissen kikelt kisrákokat a Nemzeti Népegészségügyi Központ (Budapest) tenyészetállományából különítettük el és használtuk fel a vizsgálatokhoz. A vizsgálatokat 2 ismétlésben végeztük. 10-10 fiatal egyedet 50 ml-es teszttápközegbe helyeztünk, és 48 órán át 22 °C-on, légkondicionált helyiségben inkubáltunk. Az immobilizációt 24 óránként leolvastuk. A 7 napon keresztül levegőztetett, ellenőrzött csapvizet (ivóvizet) negatív kontrollként és hígításra használtuk. Az oldott oxigént (DO) és a pH-t a vizsgálat elején és végén mértük, hogy ellenőrizzük a vizsgálati körülményeket (pH: 7,2-9,4 és DO: 2 mg/l). A *Daphnia* akut teszt akkor tekinthető érvényesnek, ha a negatív kontrollban a mozgásképtelen egyedek száma nem haladja meg a 10%-ot, valamint a tesztelésre felhasznált állatok érzékenysége kálium-dikromát oldattal szemben beleesik a 0,6-2,1 mg/l, EC_{50} (24 óra) értéktartományba (ISO 6341).

3.6.3. Alga növekedésgátlási teszt

A teszt célja a *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F. Hindák növekedésgátlásának meghatározása volt a hígtrágya különböző hígításaiban (eredet: Culture Collection of Algae and Protozoa, UK; CCAP 278/4) növekedésgátlásának meghatározása volt a hígtrágya különböző hígításaiban. 50-50 ml-t mértünk minden mintából az

Erlenmeyer-lombikokba, és minden hígítást három-három ismétlésben elemeztünk, 1-1 alga nélküli (ún. „vak”) párhuzamossal. A mintákhoz 800 µl *Pseudokirchneriella subcapitata* exponenciális növekedés fázisában levő sejttenyészetet adtunk (105 sejt/ml). A kiindulási algasejtek sűrűségét Burker számlálókamrával (HirschmannEM Techcolor, Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm^2; 0,100 mm) és optikai mikroszkóppal (Leica Microsystems, Leica DM 2500) határoztuk meg.

Az algasejtek optikai sűrűségét 750 nm-en spektrofotométerrel (Metertech Inc., SP-830 Plus) határoztuk meg, a kiindulási optikai sűrűség 0,02 volt, ami 0 órás OD-nak felel meg. A minták mellé negatív kontrollokat (Zhender-8 tápoldat) és vaklombikokat is beállítottunk, amelyek nem tartalmaztak tesztorganizmust, de ugyanúgy kezeltük, mint a mintákhoz tartozó párhuzamosokat. A mintákat 72 órán keresztül folyamatos rázatással (100 fordulat/perc sebességgel) és világítással (8500 lux) 24 °C-on inkubáltuk (WitegLabourtechnik GmbH, Witeg WIS-RL Shaking Incubator). A sejtsűrűséget 750 nm-en spektrofotométerrel (Metertech Inc., SP-830 Plus) mértük, vakoldatokhoz kalibrálva. A teszt akkor érvényes, ha a kontrollban a sejtszaporodás legalább 16-szoros, a pH értéke nem változik 1,5 egységnél többet, a kontrollok napi növekedési rátáinak variációs koefficiense nem lehet nagyobb 25%-nál (ISO8692).

3.6.4. Fitotoxicitási teszt

A fitotoxicitási teszteket a Microbiotests Phytotoxkit TK62L tesztkészletével végeztük, a mezőgazdasági vetőmagok csírázásának és a gyökérnövekedésének a tesztelésére (ISO 18763). A vizsgálatainkhoz egyszikű (Cirok-*Sorghum bicolor* L.; Tritikálé- *Triticosecale* C.), és kétszikű (Fehér mustár- *Sinapis alba* L.; Kerti zsázsa- *Lepidium sativum*

L.; Hajdina- *Fagopyrum esculentum* M.) növényeket használtunk. A toxikológiában gyakran alkalmazott tesztnövényeket és takarmánynövényeket használtunk a tesztelés során. A kísérlethez használt talajunkat a vizsgált gazdasághoz tartozó szántóföldről 0-30 cm-es mélységből vettük, melynek pH-értéke 7,2; Arany-féle kötöttségi száma 31; humusztartalma 1,25 %; vízben oldható összes só tartalma >0,04 m/m%; szénsavas mésztartalma 4,2 m/m%; és nitrogén-nitrit-nitrát tartalma 25 mg/kg.

A teszttalajt légszárazra szárítottuk és a fent leírtak alapján meghatároztuk a víztartó képességet. A vizsgálat során 90 cm^3 teszttalajt kevertünk össze 30 ml hígtrágyával és annak különböző hígításaival. Tálcánként tíz magot helyeztünk el egyenlő távolságra a tesztlemez középső gerincéhez közel; a lemezeket ezután lefedtük, függőlegesen egy tartódobozba helyeztük, és 25 °C-on 3 napig inkubáltuk Pol_Eko_Aparatura 4.81 Inkubátorban. Miután letelt az inkubációs idő, megmértük a gyökerek hosszát, és a kontroll mintákhoz képest kiszámoltuk a növekedésgátlást. Az összes növényt 5 ismétlésben vizsgáltuk. A csíranövény növekedési teszt akkor tekinthető érvényesnek, ha a csírázási átlag legalább 70%, és a kontroll gyökerének átlagos hossza legalább 30 mm (MicroBioTest 2018).

3.7. Statisztikai módszerek ismertetése

Kapcsolatot kerestünk a két válaszváltozó (folyékony hígtrágya és iszap ösztrogénhatása negyedévekre átlagolva, µg/L) és a negyedévekre összegzett háttérváltozók következő három csoportja között:

1) bejuttatott hatóanyagok mennyisége (mg) hatóanyagonként (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol, dinoproszt-trometamin) és összesítve;
2) kezelések száma gyógyszerenként (Ovarelin, PGF, Gonavet, Dinolytic, Alfaglandin) és összesítve;
3) kiegészítő háttérváltozók (termékenyítések száma, ellések száma, holtellések száma, vetélések száma).

Az n=16 méretű adatsor elemzése során először az összes változó közötti korrelációs kapcsolatot Pearson-féle korrelációs együtthatóval számszerűsítettük. Ezután főkomponens-elemzést (Principal Component Analysis; PCA) végeztünk. A PCA során a két, ösztrogénhatást leíró válaszváltozót használtuk az ordinációs tér kifeszítésére, és erre a térre illesztettük a hatóanyagokat leíró háttérváltozókat permutációs módszerrel, melyben 1000 ismétlést alkalmaztunk. Az elemzéseket R statisztikai szoftverrel (R CORE TEAM 2020) és annak "vegan" csomagjával (OKSANEN *et al.*, 2020) végeztük.

4. Eredmények, értékelésük és következtetések

Az eredmények kiértékelésénél a következő gondolatmenet alapján haladtunk:

- Először meghatároztuk a hígtrágya és a telepen hasznát ivarzásindukáló hormonok ösztradiol ekvivalens (EEQ) értékét, mellyel azokat a területeket kezelték, ahol a kísérleteinket végeztük.
- Ezután meghatároztuk a talaj EEQ értékét, melyeken a leendő szántóföldi kultúrákat termesztették, és ahová a hígtrágyát kijuttatták.
- Ezután a termesztés során több időpontban, több fenofázisban meghatároztuk a növényi részek (gyökér, hajtás, termés) EEQ értékét.
- Végül pedig különböző időpontokban megmértük a betakarított tömegtakarmány EEQ értékét is a tejsavas erjedés után.

Így átláthatóbb képet kaptunk az ösztrogén körforgásról, mely a telepről kikerülő hígtrágyával jut a szántóterületekre, majd onnan tömegtakarmány formájában visszakerül a telepre, ahol az állatok etetésével bekerül a táplálékláncba.

Fő vizsgálati módszerünk az *in vitro* élesztőteszt volt, az ösztradiol ekvivalens értékek meghatározását a következő szubsztrátokon végeztük:

- ivarzásindukáló gyógyszerek
- hígtrágya (negyedévente a folyékony és iszap részt)
- talaj
- növényi részek (gyökér, hajtás, termés)

Ezt követték a kiegészítő vizsgálatok: *in vivo* zebradánió teszt, műszeres analitikai mérések és a toxikológiai tesztek.

A vizsgálatok sorrendje a mezőgazdasági termelés logikáját követi:

trágya → talaj → gyökér → hajtás → termés → takarmány.

4.1. *In vitro* élesztőteszt eredményei

4.1.1. Hígtrágya ösztrogénhatás-vizsgálatának eredményei

A 2017-2020 között végzett, negyedéves gyakoriságú méréseink szerint, melyet a hígtrágya folyékony és iszaprészére egyaránt elvégeztünk, jól láthatjuk, hogy 2017-től folyamatosan emelkedtek a hígtrágya EEQ értékei (5. táblázat).

A hormonhatású vegyületek sokkal (5-6-szor) erősebben kötődnek az iszapfázishoz, mint a folyékonyhoz. A telepen 2018 második negyedévében protokoll váltás volt a termékenyítésben, mely kétszeresére növelte a felhasznált hormoninjekció mennyiségét. Ennek következtében 100 µg/l-esnél alacsonyabb EEQ értéket csak ezen időpont előtt találunk a folyadékfázisban. Későbbiekben ennek két-háromszorosa tapasztalható. Az iszapfázis mindvégig sokkal (legalább egy nagyságrenddel) magasabb EEQ értékeket adott. 2000 µg/l-es értékeket csak a protokollváltás időpontja előtt találunk, utána – egy érték kivételével – ennél jóval magasabb, akár két-háromszoros értékeket mértünk. A harmadik-negyedik negyedévi adatok jellemzően magasabbak voltak, mint az első-második negyedéviek.

4.1.2. Gyógyszerhatóanyagok ösztrogénhatás-vizsgálatának eredményei

Kutatásunk során 5 db ivarzás indukálásra használt készítményt vizsgáltunk meg (Ovarelin, Gonavet, PGF, Alfaglandin, Dinolytic), 6 különböző térfogat bemérésével (20µl; 10µl; 5µl; 1µl; 0,5µl; 0,1µl). Az ösztrogénhatást a hat bemérésből kapott értékek átlaga adta. A 0,1 µL mennyiség volt az a legkisebb mennyiség, mely nem mutatott választ az élesztőteszt során. Az öt gyógyszerben három hatóanyag (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) valamelyike található meg, ezeket a hatóanyagokat két kísérő vegyület egyikével (benzil-alkohol ill. klórkrezol) forgalmazzák.

A 6. táblázatban látható, hogy bár egyik hormon sem tartozik az endoösztrogének csoportjába, mégis az élesztőteszt során mutattak ösztrogénhatást, mely arra utal, hogy kémiai szerkezetük miatt a humán ösztrogén receptorhoz (hERα) kötődni képesek.

5. Táblázat

A hígtrágya EEQ értékei negyedéves bontásban

	2017 (µg/l)				2018 (µg/l)				2019 (µg/l)				2020 (µg/l)			
	Folyékony	***SD***	**Iszap**	***SD***	**Folyékony**	***SD***	**Iszap**	***SD***	**Folyékony**	***SD***	**Iszap**	***SD***	**Folyékony**	***SD***	**Iszap**	***SD***
1. negyedév	139,2	± 15	1337,0	± 36,5	123,9	± 9,3	1355,0	± 37,5	137,2	± 12,3	2745,0	± 240	248,1	± 15,7	2730,0	± 195
2.negyedév	61,7	± 1,6	2555,5	± 190,5	88,9	± 2	1900,0	± 37,5	156,5	± 13,3	1990,0	± 19,5	196,5	± 9,7	3490,0	± 205
3.negyedév	19,3	± 1,1	1415,0	± 135,5	225,8	± 19,9	4570,0	± 250,5	193,1	± 9,8	3200,0	± 42,5	288,0	± 20,3	6300,0	± 245
4.negyedév	19,6	± 1,4	142,0	± 8	213,8	± 17	3970,0	± 255	271,1	± 15	4990,0	± 85	373,0	± 22,3	5325,0	± 285
Éves átlag:	***60,0***		***1362,4***		***163,1***		***2948,8***		***189,5***		***3231,3***		***276,4***		***4461,3***	

6. Táblázat

A hormonhatású készítmények EEQ értékei (ng/l)

	Ovarelin	**SD**	**Gonavet**	**SD**	**Alfaglandin**	**SD**	**PGF**	**SD**	**Dinolytic**	**SD**
EEQ 20 µl	103,5	± 1,5	469,5	± 3,1	1225,5	± 4,47	1099,5	± 4,65	127,5	± 1,71
EEQ 10 µl	100,6	± 0,48	456	± 4,32	603	± 1,5	606	± 3,7	123	± 0,96
EEQ 5 µl	87,4	± 0,36	446,4	± 0,83	603,6	± 1,99	576,8	± 3,42	127,9	± 0,77
EEQ 1 µl	<LOD		783	± 0,46	516	± 0,59	1047	± 0,85	<LOD	
EEQ 0,5 µl	<LOD		<LOD		732	± 0,58	<LOD		<LOD	
Átlag	9,72		53,87		73,6		83,23		12,61	

4.1.2.1. Kloprosztenol hatóanyag ösztrogénhatása

A *kloprosztenol* hatóanyagot vizsgálva, az Alfaglandin gyógyszer 0,250 mg/ml mennyiséget, míg a PGF gyógyszer 0,092 mg/ml mennyiséget tartalmazott. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a PGF (83,23 µg/l) ösztrogénhatása magasabb volt, mint az Alfaglandiné (73,6 µg/l) (6. táblázat). Bár a 0,5 µl-es hígításban csak az Alfaglandin mutatott pozitív eredményt, azaz nagyobb hígításoknál is megmaradt az ösztrogénhatása.

4.1.2.2. D-Phe6-gonadorelin hatóanyag ösztrogénhatása

A *D-Phe6-gonadorelin* hatóanyagot vizsgálva, mely az Ovarelin és a Gonavet készítményekben található 0,050 mg/ml mennyiségben, arra a következtetésre jutottunk, hogy a Gonavet ötször magasabb ösztrogénhatású (53,87 µg/l), mint az Ovarelin (9,72 µg/l), melyet a 6. táblázatban láthatunk. A két gyógyszer között csak a kísérőanyag típusában van különbség.

4.1.2.3. Dinoproszt-trometamin hatóanyag ösztrogénhatása

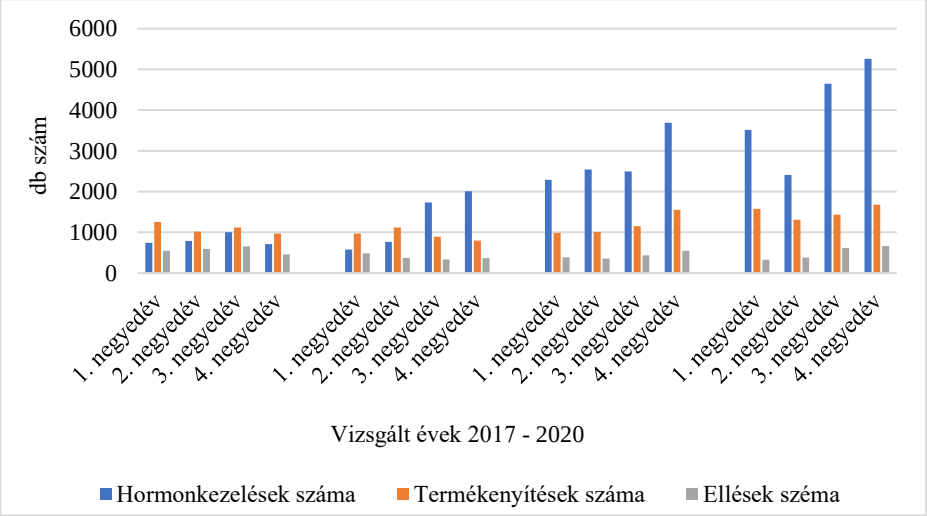
A *dinoproszt-trometamin* hatóanyag teszteléséhez egy készítmény, a Dinolytic (12,61 µg/l) gyógyszer állt rendelkezésünkre (6. táblázat), mely 5 mg/ml mennyiségben tartalmazta azt. A kísérőanyag benzil-alkohol volt, és az eredmények értékei az Ovarelin értékeihez hasonlóak.

4.1.2.4. A szaporodásbiológiai elemzés eredményei

A hormonkezelések, termékenyítések és az ellések számából következik (lásd 4. ábra), hogy 2017-től folyamatosan emelkedett a hormonkezelések száma a telepen. 2018-ban pedig váltás történt a termékenyítési protokollban, melynek következtében megduplázódott a

hormonhatású készítmények felhasználása. A legfontosabb szaporodásbiológiai mutatókat értékeltük a vizsgálati idő alatt (7. táblázat), melyek gazdasági szempontból mutatják be a telep eredményességét. Annak ellenére, hogy 2018 második felében protokollváltás (OvSynch → Dupla OvSynch) történt a telepen, nem minden mutató mozdult el pozitív irányban.

Az első termékenyítési átlag nap 93-napról 69-re csökkent, viszont az első termékenyítésre vemhes állatok száma átlagosan 41,22 és 47,29 százalékról 32,08-ra csökkent. Az átlagos termékenyítési index a protokollváltás után javuló tendenciát mutatott, de az utolsó vizsgált évben voltak a legrosszabb eredmények (külső okok miatt).



4. Ábra: Szaporodásbiológiai mutatók értékelése

Az átlagos szerviz periódus napok száma és az átlagos laktációs napok száma csökkent, mely maximalizálja a telep tejhozamát.

7. Táblázat: Szaporodásbiológiai mutatók értékelése. A táblázat sorai a vizsgált paraméterek változásait tartalmazzák a vizsgálati évek (2017-2020) szerinti bontásban. [1] a tehén tejtermelésben eltöltött napjainak a száma. [2] az első termékenyítés és az eredményes vemhesülés között eltelt idő. [3] hányadik termékenyítésre sikerült vemhesíteni az adott állatot. [4] az ellés után történő első termékenyítésig eltelt napok száma átlagosan. [5] az első sikeres termékenyítés százalékos átlaga.

Szaporodásbiológiai mutatók	**2017**	**2018**	**2019**	**2020**
átlagos laktációs napok száma[1]	194	193	162	183
átlagos szerviz periódus napok száma[2]	145	127	116	120
átlagos termékenyítési index[3]	2,37	2,21	2,07	2,47
első termékenyítés átlag nap[4]	93	82	88	69
első termékenyítésre vemhes % átlag[5]	41,22	47,29	37,97	32,08

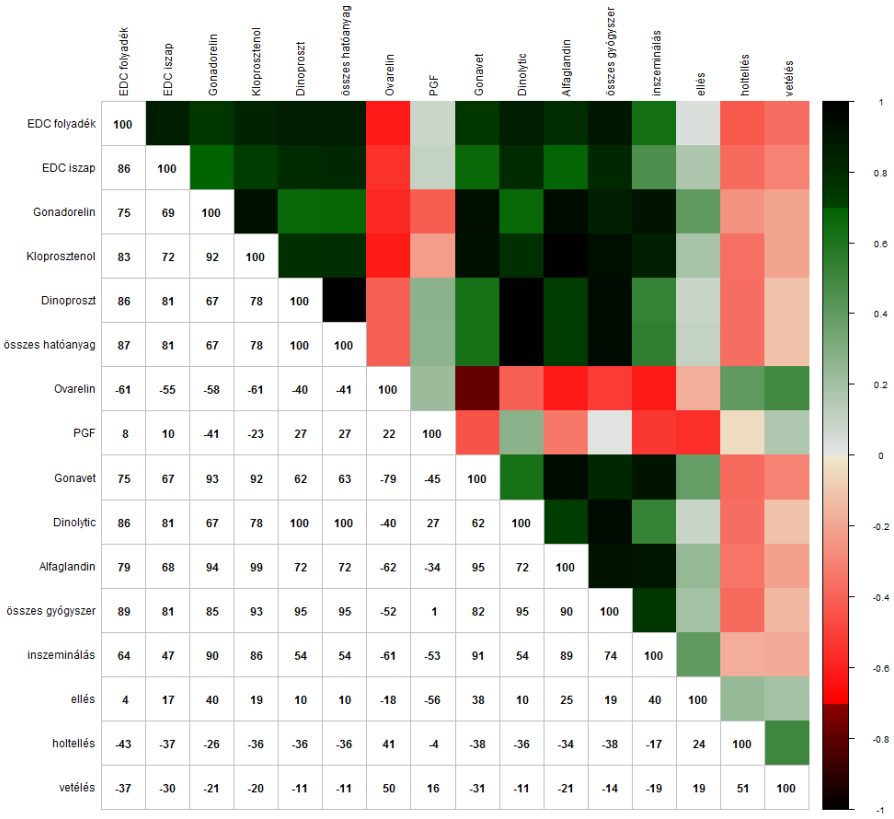
A szaporodásbiológiai mutatók eredményét számos tényező befolyásolhatja, például a termékenyítésre használt sperma minősége, éghajlati viszonyok, takarmányozás, az inszeminátorok munkájának a minősége.

4.1.2.5. Statisztikai értékelés

A két válaszváltozó, azaz a hígtrágya folyékony részének és az iszapnak a negyedévekre átlagolt ösztrogénhatása erősen összefügg ($r=0,86$, $n=16$, $p<0,001$). A hígtrágya folyékony részének ösztrogénhatása erősebb kapcsolatot mutat a háttérváltozókkal, azaz a hatóanyagokkal, gyógyszerekkel, kiegészítő háttérváltozókkal, mint az iszapé.

A Pearson-féle korreláció (5. ábra) alapján erős pozitív és szignifikáns ($p<0,001$) összefüggést mutat a hígtrágya folyékony fázisának ösztrogénhatásával a dinoproszt ($r=0,86$), a kloprosztenol

(r=0,83) és a gonadorelin (r=0,75) hatóanyag is. Az iszap ösztrogénhatásával való összefüggésük némiképp gyengébb és kevésbé is szignifikáns (p<0,01), a korrelációs együtthatójuk rendre 0,81, 0,72 és 0,69.



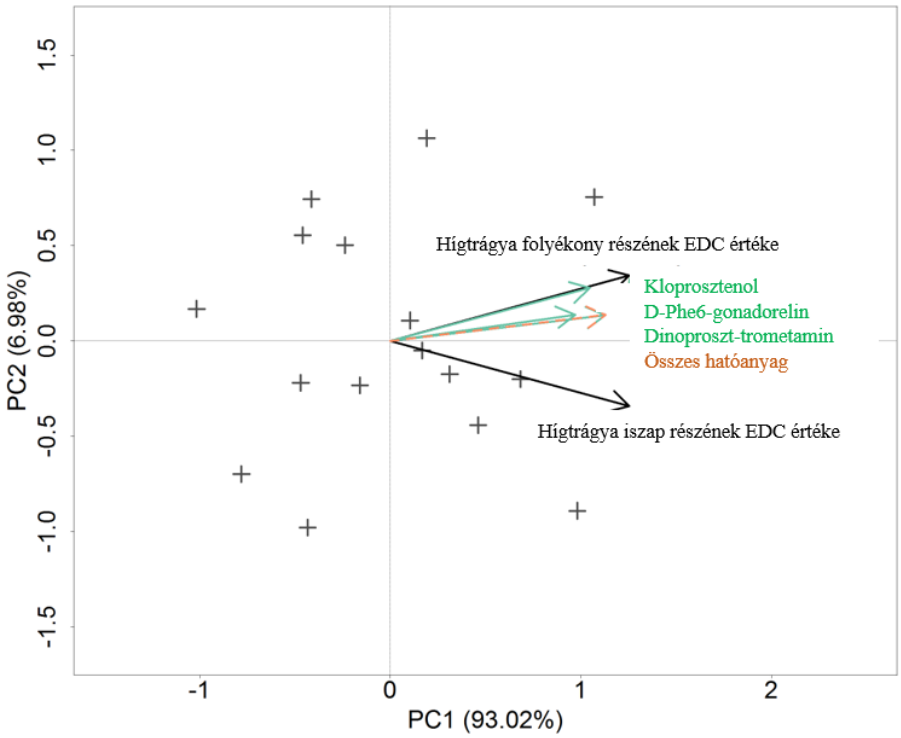
5.Ábra: A hígtrágya, a telepen alkalmazott ivarzásindukáló gyógyszerek és a szaporodásbiológiai mutatók közötti Pearson-féle korreláció

A gyógyszeres kezelések negyedéves összesített száma erős pozitív korrelációt mutat a folyékony fázis (r=0,89, p<0,001) és az iszap (r=0,81, p<0,001) ösztrogénhatásával. Ennél egy fokkal gyengébb, de továbbra is erős pozitív összefüggést látunk a folyékony fázis

ösztrogénhatása és a Dinolytic (r=0,86, p<0,001), Alfaglandin (r=0,79, p<0,001) és Gonavet (r=0,75, p<0,001) között, míg a PGF nem szignifikáns és semleges (r=0,08, p=0,76), az Ovarelin pedig negatív (r=-0,61, p<0,05) korrelációt mutat. Az iszap ösztrogénhatásával való korrelációjuk alapján a gyógyszeres kezelések hasonló módon rendezhetők sorba, a korrelációs együtthatók rendre 0,81 (p<0,001), 0,68 (p<0,01), 0,67 (p<0,01), 0,10 (p=0,70) és –0,55 (p<0,05).

A kiegészítő háttérváltozók közül az inszeminálás gyenge pozitív (r=0,64), a holtellés (r=-0,43) és a vetélés (r=-0,37) gyenge negatív, míg az ellés semleges (r=0,04) korrelációt mutatott a hígtrágya ösztrogénhatásával, melyek közül egyedül az inszeminálás korrelációja szignifikáns a 0,05-os szignifikanciaszinten. A kiegészítő háttérváltozók korrelációja az iszap ösztrogénhatásával hasonló képet mutat, az egyetlen marginális (p=0,07) szignifikanciájú összefüggést az inszeminálással találtuk (r=0,47).

A hatóanyagokra készített főkomponens-elemzés eredménye a 6. ábrán látható. Az ordináció a variancia jelentős részét, 93%-át egy főkomponensbe tudta sűríteni. E főkomponenstől csak némiképp fordul el az ordinációs teret kifeszítő, egymással erősen korreláló két válaszváltozó, vagyis a folyadékfázis és az iszap ösztrogénhatása. A hatóanyagok mindegyike a folyadékfázis ösztrogénhatása irányába mutat, közülük is a kloprosztenol köthető leginkább a hígtrágya folyékony fázisához az iszaphoz viszonyítva. A legkevésbé specifikusnak a dinoproszt, valamint a hatóanyagok összes mennyisége bizonyul.



6.Ábra: Főkomponens elemzés (PCA): A két válaszváltozó által (hígtrágya folyékony és iszap része) létrehozott ordinációs tér és a háttérváltozók (hatóanyagok) láthatóak. A + az egyes mérési időpontokat jelöli, a nyilak iránya azt mutatja, hogy melyik főkomponenssel korrellál leginkább az adott változó, a nyíl hossza az összefüggés nagyságát láttatja. (Fekete színnel jelöltük a hígtrágya folyékony és iszap frakcióját, zölddel a hatóanyagokat és narancssárgával az összes hatóanyagot).

4.1.2.6. Következtetések a hígtrágya és gyógyszerhatóanyagok vizsgálatához

Kutatásunkban egy Pest megyei szarvasmarha telepen használt 5 különböző ivarzás indukáló gyógyszer sorsát követtük nyomon a felhasználástól egészen a hígtrágyában való megjelenésükig. A tanulmány során áttekintettük a telepen alkalmazott ivarzás indukáló gyógyszerek felhasználását 2017-től 2020-ig és meghatároztuk az 5 gyógyszer ösztrogénhatását is. A hormonhatású anyagok toxikológiai kockázatértékelését bonyolítja egyrészt a többféle expozíciós út, másrészt a nem-monoton dózis-válasz görbék, ahol a válaszok a dózistartományban nőnek és csökkennek is, vagy a keverékeken belüli vegyi anyagok közötti kölcsönhatások is megnehezítik az értékelést (Jobling *et al.,* 2009).

Jobling és munkatársai (2009) kimutatták, hogy a kémiai analitika és az élesztőteszt eredményei nem összehasonlíthatóak, és a minták ösztrogén aktivitása (EEQ) nem korrelál jól az egyes szteroid ösztrogének mért analitikai koncentrációival. A korreláció hiánya a mintákban található antiösztrogén vegyületeknek tudható be, amelyek csökkentik az élesztővizsgálatban látható választ. Az élesztőteszt által kapott eredmények környezeti szempontból relevánsabbnak tekinthetők, mivel a vegyianyagok közötti kölcsönhatások észlelhetők és ezért magasabb prediktív értékkel bírnak, amikor az emberi egészség szempontjából fontos lehetséges hatásokat mérni kell (Jobling *et al.,* 2009).

Mi is ezért választottuk fő vizsgálati módszernek az élesztőtesztet. Bár egyes hormonkészítmények ugyanazt a hatóanyagot tartalmazzák, mégis más ösztrogénaktivitást mutattak a kísérőanyagtól függően. Minél magasabb EEQ értéket kaptunk egy gyógyszerre, annál erősebb hormonhatása van az adott szernek. Fontos megemlíteni, hogy ezeket az

értékeket a tényleges hatóanyag és az elvileg nem hormonhatású segédanyag együttes jelenléte esetén kaptuk. A két anyag együttes jelenléte lehetővé teszi, hogy közöttük kémiai/biokémiai interakció (szinergizmus vagy antagonizmus) valósuljon meg.

A 6. táblázat adataival összevetve azt kapjuk, hogy a Gonavet klórkrezoltartalma a D-Phe6-gonadorelin hatóanyag hormonhatását szinerg módon úgy felerősítette, hogy 5,54-szer nagyobb EEQ értéket kaptunk, mint az Ovarelinre. Tehát egy alacsony hormon és magas szinerg segédanyag tartalmú injekció képes kiváltani azt a fiziológiai hatást (ovuláció, sikeres inszeminálás, várhatóan magasabb tejhozam), mint a magas hormon-, de nem szinerg segédanyag (benzil-alkohol) – tartalmú injekció. Az állat szervezetébe jutva az oltás a szinergiának megfelelően kifejti magas hormonhatását, magas hormontartalmat *imitálva* (látszólagos hormonhatás), ugyanakkor az állat szervezetében a fő- és segédanyag külön metabolizálódik, a szinerg hatás megszűnik, és a hígtrágyában már, mint alacsony koncentrációjú hormonszennyezés jelentkezik. (Az UHPLC mérések során mindkét segédanyagot vizsgáltuk, de mindkettő kimutatási határ alatt volt).

Hipotézisünket az is igazolja, hogy az eleve magas hormontartalmú Alfaglandin még nagyobb hígításban (0,5 µl / 120 µl) is megtartotta ösztrogénhatását, sőt ennél a bemérésnél csak az Alfaglandin mutatott pozitív ösztrogénhatást (lásd 4. táblázat). Bár dinoproszt hatóanyaggal mindössze egy készítmény állt rendelkezésre (Dinolytic) mégis indirekt módon, de ez is erősíti hipotézisünket, hiszen átlagos EEQ értéke mindössze 12,61 volt, jelezvén, hogy a benzil-alkohol segédanyag a viszonylag magas koncentráció (16,5 mg/ml) ellenére sem lép szinergiába a dinoproszt hatóanyaggal. A fentiek alapján az a stratégiai javaslat

fogalmazható meg a gyakorlat számára, hogy a rendelkezésre álló készítmények közül olyat érdemes választani, amely a fő hatóanyagtól függetlenül szinerg segédanyagot (klórkrezol) tartalmaz.

A vizsgált gyógyszerek a xenoösztrogének hatásmechanizmusa szerint mutattak ösztrogénhatást ugyanis, ha megnézzük a vizsgált vegyületeink szerkezeti képletét, hasonlóságot figyelhetünk meg az ösztrogéncsoport vegyületeivel. Az alkalmazott vegyületek egyes ligandumai kötődni tudnak a receptorok azon platformjaihoz, amelyek a valódi ösztrogének adekvát csoportjait kötnék meg. Ha a tradicionális kulcs-zár elmélethez hasonlítjuk az ösztrogének kötődését a receptorokhoz, akkor egy „álkulcs-zár" szituációval állunk szemben: kémiailag más, de a kémiai szerkezetükben hasonló vegyületek váltanak ki hasonló biológiai hatást. Amikor mi ezeknek az anyagoknak az EEQ-értékeit mérjük, valójában ennek a folyamatnak a biokémiai leképeződését látjuk.

A gyógyszerek hatására különféle hormonális változások zajlanak le a kezelt állatoknál, mely a természetes eredetű hormonok kiválasztását célozza. A gyógyszer ürülése az állati szervezetből további ösztrogénterhelést jelent a környezetre. A vizsgált gyógyszereket nagy mennyiségben használják fel a telepen, melynek mennyiségeit a 4. ábra szemlélteti. A hormonkezelések számából és a termelésben résztvevő tehenek egyedszámából kiszámoltuk, hogy 2017-ben 0,68 kezelés jutott egy tehénre, 2018-ban 1,02, 2019-ben 1,73 és 2020-ban már 2,2. Megállapítottuk, hogy 2017-től folyamatosan emelkedett a hormonkezelések száma, és ezzel arányosan a hígtrágya ösztrogéntartalma is emelkedni kezdett. Az első (2017) és utolsó (2020) vizsgált év között

majdnem négyszeres EEQ-érték-emelkedés figyelhető meg a hígtrágyában.

Megállapítottuk, hogy a hígtrágya folyadék fázisának ösztrogénhatása és az iszap ösztrogénhatása erősen összefügg. A hígtrágya folyékony fázisa mégis szinte minden vizsgált paraméterrel erősebb korrelációt mutatott, vagyis az közvetlenebb módon köthető a kijuttatott gyógyszerekhez, azok gyorsabban jelennek meg a folyékony, mint az iszap fázisban (6. ábra). Mindhárom vizsgált hatóanyag erős összefüggést mutatott a hígtrágya folyékony és iszap fázisának ösztrogénhatásával. Szignifikáns összefüggést a kloprosztenol hatóanyag adott, mely az Alfaglandin és a PGF készítményekben volt. A gyógyszerek tesztelése során ez a két készítmény mutatta a legmagasabb ösztrogénhatást is. Szignifikanciát tekintve ezt követte a gonadorelin hatóanyag, mely szintén két készítményben volt, a Gonavet és Ovarelinben, majd a dinoprosztrometamin hatóanyag, mely a harmadik legerősebb ösztrogénhatású anyag, mely a Dinolyticben volt jelen.

Azt tapasztaltuk, hogy a hatóanyagok erősen korreláltak a hígtrágya folyékony fázisának ösztrogénhatásával. A folyadék fázis ösztrogénhatásával erős pozitív korrelációt mutatott az Alfaglandin, kissé gyengébb, de szintén pozitív korrelációt mutatott a Gonavet és a Dinolytic is. A PGF semleges, míg az Ovarelin, mely a legkisebb ösztrogénhatást mutatta az élesztőteszt során, negatív korrelációt mutatott.

A holtellés és a vetélés negatív korrelációt mutat a hígtrágya/iszap ösztrogéntartalmával, azaz minél kisebb volt a hígtrágya ösztrogéntartalma, annál több volt a holtellés és vetélés.

Az inszeminálás, bár gyenge, de pozitív korrelációt mutatott a hígtrágya folyékony fázisának ösztrogéntartalmával. Elemzésünk szerint a

PGF és az Ovarelinnel végzett kezelések száma nem vagy negatívan hatott a hígtrágya/iszap ösztrogénhatására, mely az eredmények fényében feltehető, hogy ezen gyógyszerekkel végzett kezelések kisebb veszélyt jelentenek a környezetre, ha később a hígtrágya felhasználásra kerül.

Vizsgálataink azt igazolják, hogy a mesterséges hormonkezelések ökológiai lábnyoma azzal csökkenthető, ha nem a tényleges, hanem a látszólagos hormonhatást növeljük meg.

A hagyományos szarvasmarhatartási technológiák gazdaságilag kevésbé kifizetődőek, az intenzív technológiák működése viszont elképzelhetetlen az irányított hormonprogramok (OvSynch, DuplaOvSynch…) nélkül. Az intenzív technológiák ára, hogy a kijuttatott trágyában magasabb koncentrációban jelennek meg olyan anyagok (hormonok, antibiotikumok, különböző vegyi anyagok), melyek negatív hatással lehetnek a környezetre.

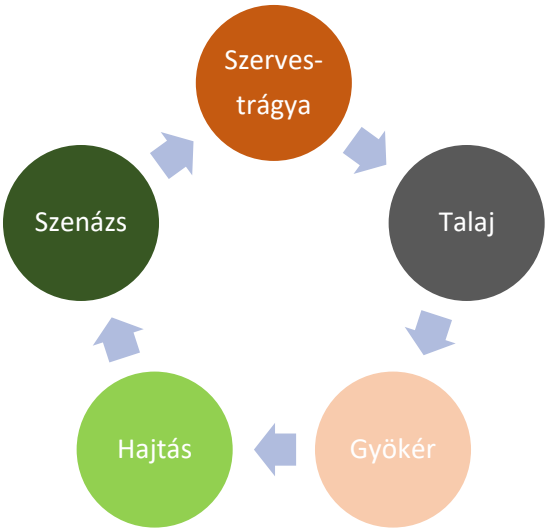
A hígtrágya EDC szintje függ a kezelési tényezőktől és az állatok által kiválasztott ösztrogének mennyiségétől, amelyet befolyásol a faj, kor, nem, vemhességi időszak (Lorenz *et al.,* 2004) és az ivarzásindukáló kezelések gyakorisága is (Gubó *et al.,* 2022). Mindezek a tényezők nagy ingadozást okozhatnak az ösztrogének trágyában mérhető koncentrációjában.

A hígtrágya egy olyan anyagnak tekinthető, melyet a szántóföldre történő kijuttatás előtt új kezelési módszerekkel kellene ártalmatlanítani, nemcsak környezetegészségügyi szempontból, hanem a humán egészségügyi kockázatok miatt is.

A témában nemzetközi szinten is kevés anyag áll rendelkezésre, ezért fontosnak tartjuk az ezirányú kutatásokat és a nagy tételben kivitelezhető, gazdaságos kinyerési eljárások kidolgozását.

4.1.3. Az olaszperje (*Lolium multiflorum* L.) termesztése és vizsgálata

Az olaszperje vizsgálatát a szántóterületekre kijuttatott szervestrágya EEQ értékének a meghatározásával kezdtük. Minden negyedévben megvizsgáltuk a kijuttatott hígtrágyát és kiszámoltuk az EEQ értékét. A hígtrágyát átlagosan 10% szárazanyagtartalommal juttatták ki a területekre, így az EEQ érték számolásánál ezt is figyelembe vettük. Ezt követte a talaj EEQ értékének, majd a növények gyökér, hajtás és a betárolt erjesztett tömegtakarmány (fűszenázs) EEQ értékének a meghatározása.



7. Ábra: Folyamatábra az olaszperje fejlődési és vizsgálati fázisairól

Kutatásunk során 2 kontroll, 2 istállótrágyázott és 4 hígtrágyázott területet vizsgáltunk meg. Összesen 48 db talajmintát, 32 db növénymintát (gyökér, hajtás, tömegtakarmány) és 8 db fűszenázs mintát vizsgáltunk meg.

A hígtrágyázott területekre 300 és 380 köbméter közötti hígtrágyamennyiséget locsoltak ki hektáronként. Az istállótrágyázott

területeken 69 és 82 tonna/ha trágyát juttattak ki. Míg a kontroll területeken nem történt szervestrágya kijuttatás (8. táblázat). A hígtrágya és istállótrágya EEQ értékeit az élesztőteszttel határoztuk meg.

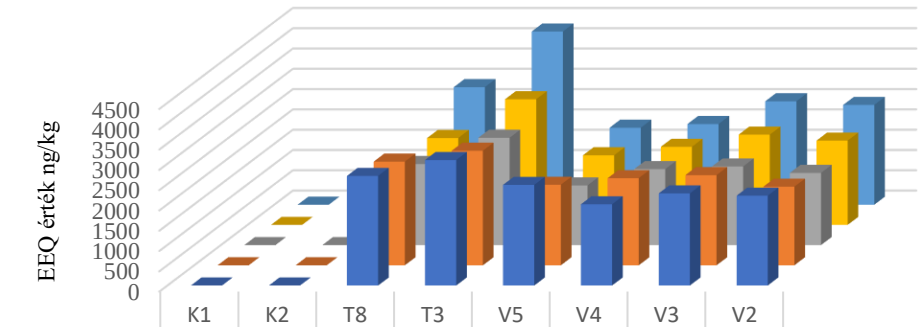
8. Táblázat: A vizsgált területekre kijuttatott szervestrágya mennyisége a vizsgált kultúra vetése előtt és a területekre kijuttatott szervestrágya EEQ értéke (1 liter hígtrágya 0,9 liter folyékony és 0,1 l iszap (szilárd fázisnak felel meg).

Szervestrágya kijuttatás	***Kontroll***		***Istállótrágya (t/ha)***		***Hígtrágya (m^3/ha)***			
	K1	**K2**	**T8**	**T3**	**V5**	**V4**	**V3**	**V2**
	0	0	69	82	300	310	380	350
EEQ érték (g/ha)	0	0	189,4	225,1	119,3	123,3	188,6	173,7

A rendelkezésünkre álló földterületeket próbáltuk úgy összeválogatni, hogy minél jobban hasonlítsanak egymáshoz. Agrokémiai szempontból homok, homokos vályog és vályog talajokon végeztük a vizsgálatainkat. A talajok humusztartalmát a gyenge és jó minőség közé lehet besorolni (1. táblázat). Az összes vizsgált talajunk kémhatása gyengén lúgos volt.

4.1.3.1 Az olaszperje talajmintáinak eredményei

A vizsgált terület EEQ értékei mind 2000 ng/kg felett kezdődtek (8. ábra), majd az idő előrehaladtával szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető mind a hígtrágyázott, mind pedig az istállótrágyázott területeken. A 4. mintavételig ez a tendencia volt jellemző, melyet a tavaszi 34%-os ammónium-nitrát műtrágya kijuttatás (200 kg/ha) után vettünk. Ettől az időponttól kezdődően ugrásszerűen megemelkedtek a szervestrágyával kezelt talajok EEQ értékei.



	K1	K2	T8	T3	V5	V4	V3	V2
1.mintavétel	0	0	2700	3091	2478	2001	2269	2212
2.mintavétel	0	0	2554	2823	1984	2145	2221	1936
3.mintavétel	0	0	1997	2644	1469	1872	1937	1779
4.mintavétel	0	0	2140	3096	1715	1924	2224	2077
5.mintavétel	0	0	2896	4267	1896	1987	2548	2457
	Kontroll		***Istállótrágya***		***Hígtrágya***			

8.Ábra: A vizsgált területek talajainak EEQ értéke (SD<7%; ng/kg légszáraz talajra vonatkoztatva)

Feltételezéseink szerint az egyik lehetséges ok, hogy a műtrágya savasító hatása miatt mobilizálódtak az ED anyagok a talajban. A pH optimális szint feletti növelése vagy csökkentése hatással lehet a talaj természetes folyamataira. A mezőgazdasági műtrágyák nem megfelelő vagy túlzott használata következtében az ammónium részt vesz a savasodási folyamatokban, miután a talajban NO_3^- -á nitrifikálódik (Weldeslassie *et al.*, 2018).

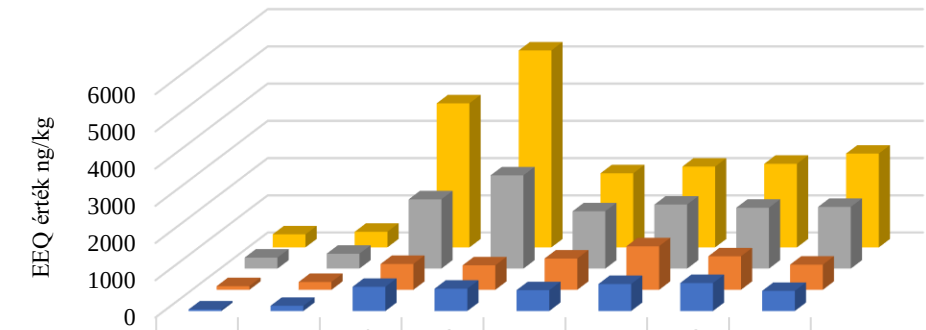
Egy másik lehetséges magyarázat, hogy ha egy nitrogén-limitált rendszerbe jelentős mennyiségű nitrogént juttatunk, az beindít többféle biológiai/biokémiai folyamatot, melynek egyik eredménye EDC anyagok feltáródása is lehet a talajban. A talaj felett ugyanakkor a kultúrnövény buja növekedéssel reagál a nitrogéntöbbletre. Azt tapasztaltuk, hogy az

erőteljes növekedés együtt jár az EDC vegyületek fokozott jelenlétével a növények gyökér és hajtás mintáiban. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a talajban található mész valamilyen szinten képes megkötni az EDC-ket, mivel a csak gyengén meszes talajban (T3) nagyobb emelkedés figyelhető meg a műtrágyázás és a talaj EDC mennyiségei között.

Az istállótrágyából a T3-as területre, míg a hígtrágyából a V3-as területre történt a legtöbb kijuttatás. A talajminták EEQ értékei ezeken a területeken a legmagasabbak. A műtrágyakijuttatás után az istállótrágyázott területek EEQ értékei sokkal nagyobb mértékben emelkedtek, mint a hígtrágyázott terület esetében. Az istállótrágya szilárd anyagnak tekinthető, az ösztrogénhatású anyagok pedig kötődni képesek az üledékekhez, ezzel is magyarázható a magasabb ösztrogénszint emelkedés. Az istállótrágya hosszabb idő alatt tároódik fel a talajban, mint például a hígtrágya, melynek kisebb része csupán a szilárd fázis.

4.1.3.2 Az olaszperje gyökerének eredményei

A növényminták gyökerében a kontroll növényeknél 43-tól 420 ng/kg ösztrogénkoncentrációt mértünk. Az istállótrágyázott területeken pedig 600-tól 5290 ng/kg értékeket kaptunk (9. ábra). Érdekes, hogy az istálótrágyázott területeken minden esetben magasabb ösztrogénhatást mértünk mint a hígtrágyázott területek esetében. A hígtrágyázott területek EEQ értékei nagyon hasonlóan alakultak, az utolsó minták esetében nincs olyan mértékű ugrás, mint az istállótrágyázott területeknél. A gyökerekben mért EEQ értékek tendenciája a talajban mért EEQ értékekhez hasonlítanak.

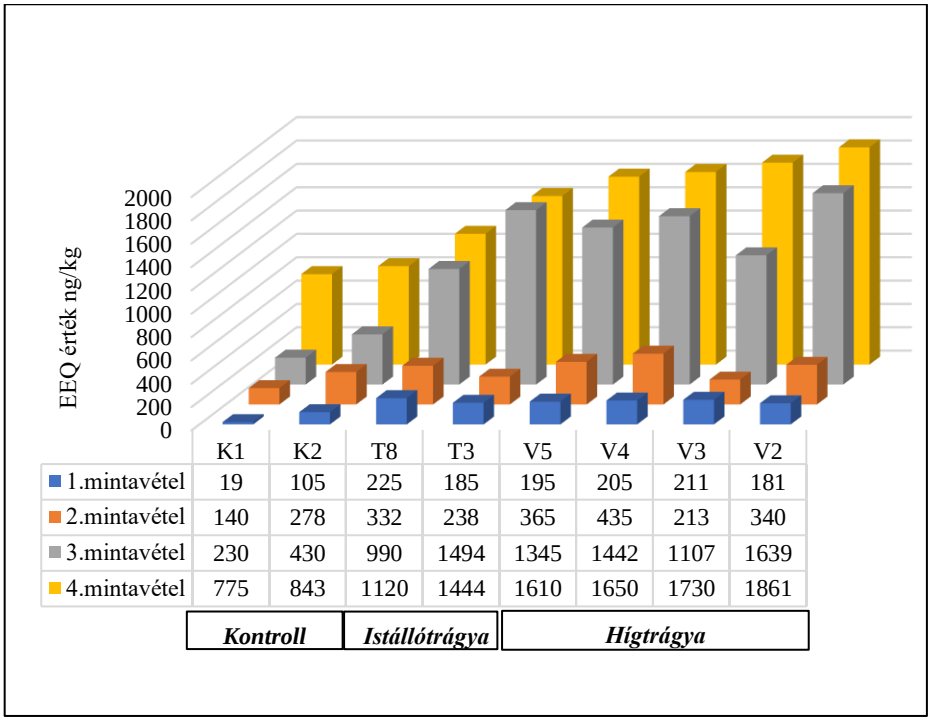


	K1	K2	T8	T3	V5	V4	V3	V2
1.mintavétel	43	140	650	600	560	725	752	540
2.mintavétel	98	210	695	658	840	1170	900	676
3.mintavétel	295	400	1860	2505	1540	1720	1634	1657
4.mintavétel	350	420	3870	5290	1990	2170	2245	2519
	Kontroll		***Istállótrágya***		***Hígtrágya***			

9. Ábra: Az olaszperje gyökerének EEQ értéke (SD<4%; ng/kg szárazanyag)

4.1.3.3 Az olaszperje hajtásának eredményei

Az olaszperje hajtásának EEQ értékei a hígtrágyázott területek esetében voltak a legmagasabbak (10. ábra). 181 és 1861 ng/kg közötti értékeket mértünk. Míg a gyökérminták esetében az istállótrágyázott területek értékei kimagaslóak voltak, addig a hajtásban alacsonyabb koncentrációt mutattak, mint a hígtrágyázott területek esetében mért koncentrációk.



10. Ábra: Az olaszperje hajtásának EEQ értéke (SD<4%; ng/kg szárazanyag)

A kontroll területen mért növények is pozitívak lettek a vizsgálat során, de értékük sokkal kisebb volt (19-843 ng/kg), mint a szervestrágyázott terület növényei. Mivel a kontroll területen nem történt ösztrogén kijuttatás, ezért ebben az esetben a kapott értékeket a fitoösztrogének jelenlétének tulajdonítjuk. Úgy gondoljuk, hogy a kontroll növények EEQ értékei felelnek meg az olaszperje normális ösztrogénhatásának. A szervestrágyával kezelt területeken pedig jól láthatjuk, hogy az ösztrogénterhelés milyen módon befolyásolja a növények ösztrogéntartalmát.

Ha megnézzük a vizsgált területeinkről betakarított növények mennyiségét (10. táblázat), ki tudjuk számolni az EEQ értékek alapján,

hogy az adott területről mekkora mennyiségű EDC anyagot tároltunk be a tömegtakarmányok betakarításával. Egyértelműen látni, hogy a hígtrágyázott területekről sokkal nagyobb mennyiségben került le ösztrogénhatású anyag, mint az istállótrágyázott és kontroll területekről. A növénytermesztésben három év tartamhatással számolnak az istállótrágya esetében. Mivel az istállótrágya az ösztrogénhatású anyagokat is sokkal koncentráltabb és kötöttebb formában tartalmazza, mint a hígtrágya, ezért ebben az esetben is úgy gondoljuk, hogy számíthatunk tartamhatással. Az istállótrágya tápanyagtartalmának a feltáródásában számos mikrobiológiai tevékenység játszik szerepet, melyek szintén hatással lehetnek az ösztrogénhatású vegyületek előfordulására és mennyiségére.

10. Táblázat: A vizsgált területekről betakarított olaszperje mennyisége és EEQ értéke

Terület	Kijuttatott EEQ/ha (g/ha)	Növény EEQ értéke betakarításkor (ng/kg)	Betakarított mennyiség (kg/ha)	EDC (mg/ha)
K1	0	775	5 800	4,5
K2	0	843	5 200	4,4
T3	374,7	1444	5 800	8,4
T8	220,8	1120	5 400	6,1
V2	231,1	1861	6 800	12,7
V3	251	1730	6 500	11,2
V4	153,1	1650	7 200	11,9
V5	148,1	1610	5 900	9,5

Az olaszperje betakarítása kaszálással kezdődött, majd a rendterítés után szikkasztották; a betárolás általában 35-40% közötti nedvességtartalommal történik. Ezt követte a rendsodrás, majd a silózás. Silózáskor a lekaszált olaszperjét egyforma szecskaméretűre aprították, majd behordták a telepre és a kijelölt silófakkba betárolták. A tárolás során

tömörítették, majd légmentesen lezárták. Az oxigéntől elzárt fűszenázsban tejsavas erjedés indult be, mely megvédte az anyagot az aerob rothadástól. A tejsavas erjedés után készen állt a tömegtakarmány a tehenek etetésére. Ezért a silófakkok megmintázására csak az erjedési folyamat lezárulta után került sor, 3 különböző helyen, a betakarítástól eltelt 40., 90. és 160. napon két-két mintával (lásd 11. táblázat).

11. Táblázat: A fűszenázs EEQ értékei a vizsgált években a betárolástól eltelt napok függvényében

Minta megnevezése	Betárolástól eltelt napok száma	EEQ érték (ng/kg), SD
Fűszenázs 2019/1	40	1525 ± 34
Fűszenázs 2019/2	90	1350 ± 11
Fűszenázs 2019/3	160	1770 ± 17
Fűszenázs 2020/1	40	1580 ± 9
Fűszenázs 2020/2	90	1795 ± 26
Fűszenázs 2020/3	160	1610 ± 42

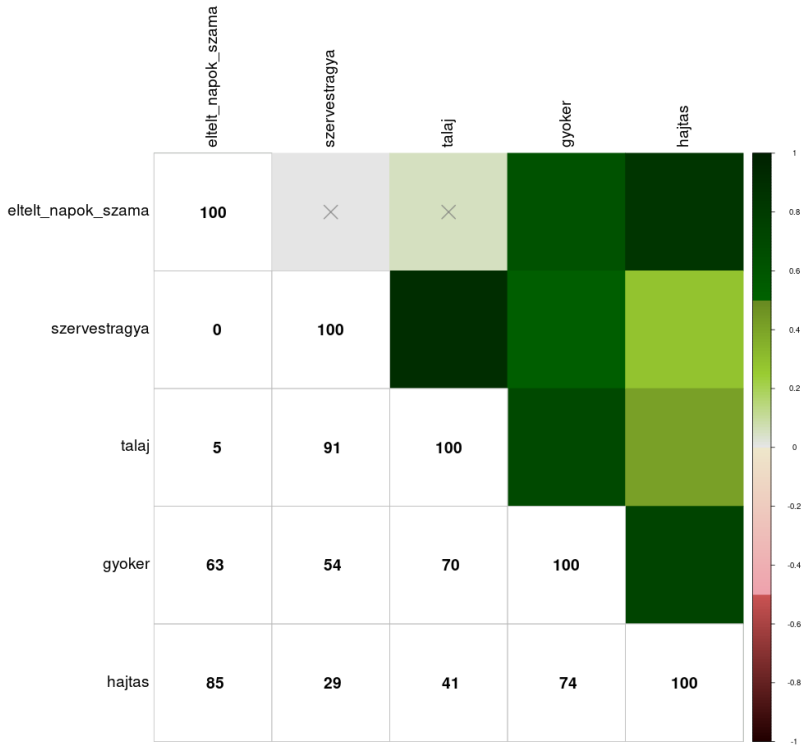
A betakarítás előtti hajtásminták és a megvizsgált fűszenázs EEQ értékei (11. táblázat) is hasonló eredményeket mutattak, ami azt jelenti, hogy a tejsavas erjedés 160 nap tárolás után sem befolyásolta az ösztrogének mennyiségét, nem csökkentette azt egyik vizsgált évben sem.

4.1.3.4. Statisztikai kiértékelés az olaszperje eredményeihez

A Pearson-féle korreláció szinte minden vizsgált változópár között szignifikáns ($p<0,001$) pozitív kapcsolatot tárt fel (11. ábra), kivéve az eltelt napok száma és a talaj, ahol ($p=0,054$). Az eredmények alapján a szervestrágya (hígtrágya és istállótrágya) EEQ-értéke erős összefüggést mutat a talaj ($r=0,91$), közepes összefüggést a gyökér ($r=0,54$), és gyenge összefüggést a hajtás ($r=0,29$) EEQ-értékével. A talaj EEQ-értéke erősebb szignifikanciát mutat a gyökérrel ($r=0,7$), mint a hajtás ($r=0,41$).

A gyökér és hajtás EEQ-értékei erősen összefüggenek (r=0,74). Vagyis a szervestrágya-talaj-gyökér-hajtás sorozatban a korreláció annál erősebb, minél közelebb esik két komponens egymáshoz. Közülük kiemelkedik a szervestrágya-talaj kapcsolat a szinte tökéletes korrelációjával. A trágyázástól eltelt napok számával való korrelációs kapcsolat tekintetében fordított irányt tártunk fel: a hajtás EEQ-értéke erősen korrelál (r=0,85), ezt követi a gyökér (r=0,63), majd pedig a talaj EEQ-értéke (r=0,05).

Elmondható tehát, hogy egyfajta időbeli akkumuláció figyelhető meg, melynek mértéke a talaj-gyökér-hajtás sorban gyengül.



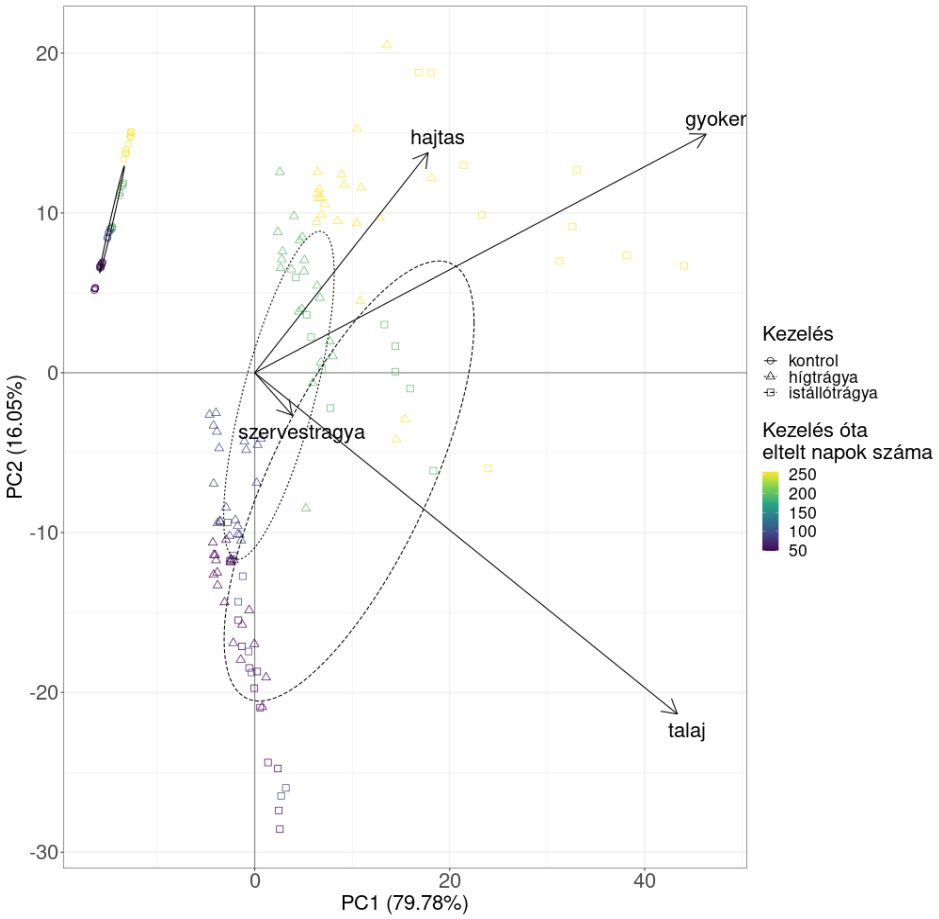
11. Ábra: az olaszperje statisztikai értékelése Pearson-féle korrelációval

A főkomponens-elemzés során a szervestrágya, talaj és a növényi részek EEQ-értéke által kifeszített ordinációs tér jól megragadta az adatokban rejlő varianciát: az első főkomponens annak 79,78%-át, míg az első két főkomponens együttesen annak 95,83%-át magyarázza (12. ábra). Mindezért az adatpontok és változók első két főkomponens által meghatározott ordinációs síkon való elhelyezkedése további tanulmányozásra és következtetések levonására alkalmas. A kontroll teljesen elkülönül a kezelt pontoktól, az EEQ értékek időbeli növekedése a fitoösztrogének termelődésre utal.

A kezelések némi átlapolással ugyan, de szintén elkülönülnek. A kezelések eképpen állíthatóak sorba: kontroll – hígtrágyával kezelt – istállótrágyával kezelt. E sorral leginkább a talajban mért EEQ-érték, illetve gyengébben bár, de a hígtrágya EEQ-értéke áll pozitív kapcsolatban.

A gyökér és a hajtás EEQ-értéke ezekre közel merőleges, vagyis ezek a változók nem kimondottan alkalmasak a kezelések elkülönítésére. A kontrollpontok mutatják a legkisebb varianciát, melyet a hígtrágyával, majd pedig az istállótrágyával kezelt pontok varianciája követ.

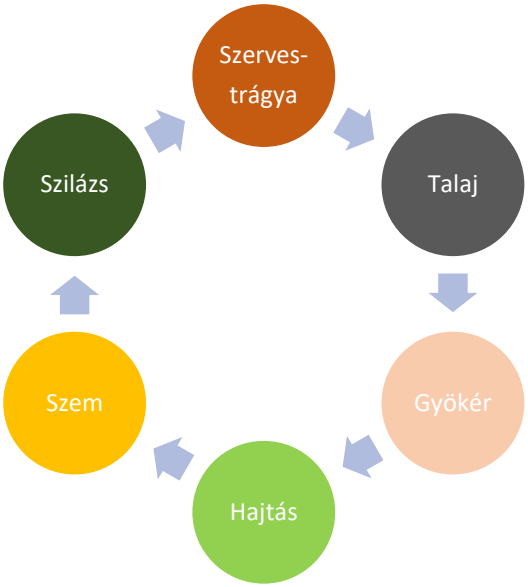
Az azonos kezelésű pontok varianciáját leginkább a kezelés/első mérés óta eltelt napok száma adja, mellyel leginkább a hajtás, s kisebb részben a gyökér EEQ-értéke mutat pozitív kapcsolatot, megerősítve a korrelációelemzéssel feltárt megállapításainkat.



12. Ábra: az olaszperje PCA modellezése

Az EEQ értékek talajban mért csökkenése annak tulajdonítható, hogy azt a növények (gyökér, hajtás) felveszik. A csökkenés egészen a tavaszi nitrogén-fejtrágyázásig tart, amely után a talajban mért EEQ értékek (3-4. mintavétel között történt) ugrásszerű növekedést mutatnak. A 9. és 10. ábrán láthatjuk az értékeket.

4.1.4 A kukorica (*Zea mays* L.) termesztése és vizsgálata



13. Ábra: Folyamatábra a kukorica fejlődési és vizsgálati fázisairól

A kukorica vizsgálatát is a szántóterületekre juttatott hígtrágya EEQ értékének a meghatározásával kezdtük. Minden negyedévben megvizsgáltuk a kijuttatott hígtrágyát és kiszámoltuk az EEQ értékét. A hígtrágyát átlagosan 10% szárazanyagtartalommal juttatták ki a területekre, így az EEQ érték számolásánál ezt is figyelembe vettük. Ezt követte a talaj EEQ értékének, majd a növények gyökér, hajtás, szemtermés és a betárolt erjesztett tömegtakarmány (kukoricaszilázs) értékének a meghatározása.

Kutatásunk során 2 kontroll, 2 istállótrágyázott és 4 hígtrágyázott területet vizsgáltunk meg. Összesen 48 db talajmintát, 32 db növénymintát, 16 db szemtermés- és 8 db kukoricaszilázs mintát vizsgáltunk meg.

A hígtrágyázott területekre 280 és 360 köbméter közötti hígtrágyát juttattak ki hektáronként. Az istállótrágyázott területeken 53 és 60 tonna/ha trágyát juttattak ki, míg a kontroll területeken nem történt szervestrágya kijuttatás. A hígtrágya és istállótrágya EEQ értékeit (12. táblázat) az élesztőteszttel határoztuk meg.

12. Táblázat: A vizsgált területekre kijuttatott szervestrágya mennyisége a vizsgált kultúra vetése előtt, és a területekre kijuttatott szervestrágya EEQ értéke

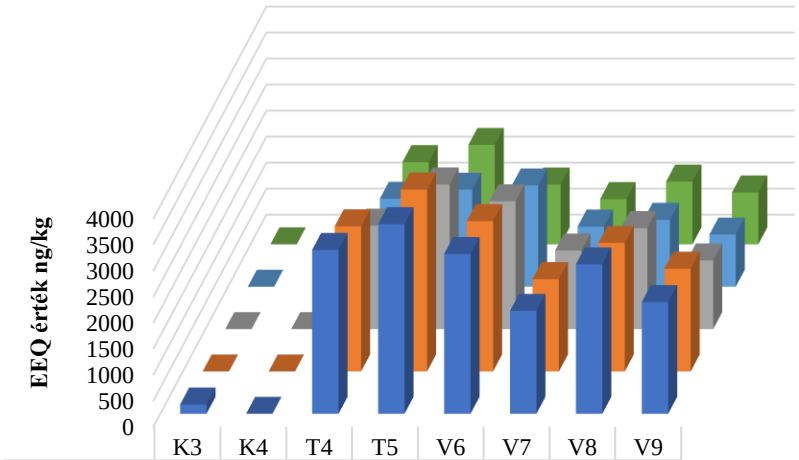
Szervestrágya kijuttatás	***Kontroll***		***Istállótrágya (t/ha)***		***Hígtrágya (m^3/ha)***			
	K3	**K4**	**T4**	**T5**	**V6**	**V7**	**V8**	**V9**
	0	0	53	60	360	280	350	320
EEQ érték (g/ha)	0	0	105,5	209,4	122,5	95,3	184,2	168,4

A rendelkezésünkre álló földterületeket a kukorica termesztése során is próbáltuk úgy összeválogatni, hogy minél jobban hasonlítsanak egymáshoz. Agrokémiai szempontból homok és homokos vályog talajokon végeztük a vizsgálatainkat. A talajok humusztartalmát a gyenge és jó minőség közé lehet besorolni (2. táblázat). Az összes vizsgált talajunk kémhatása gyengén lúgos volt.

4.1.4.1. A kukorica talajmintáinak eredményei

A vizsgált területek EEQ értékei mind 1978 ng/kg felett kezdődtek, majd az idő előrehaladtál szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető mind a hígtrágyázott, mind pedig az istállótrágyázott területeken (14. ábra). A harmadik mintavétel előtt a kukorica sorközművelő kultivátorral kultivátorozva lett, mely során 150 kg/ha 27%-os nitrogénműtrágya is kijuttatásra került. A kukorica esetében nem figyeltünk meg EEQ érték

emelkedést a műtrágyakijuttatás után (igaz, itt a hektáronkénti dózis 40,5 kg hatóanyag, míg az olaszperje esetében ez 68 kg/ha volt, további tényező, hogy az alacsonyabb dózis hatását a műtrágya mészkőliszt-tartalma tovább mérsékelte).



	K3	K4	T4	T5	V6	V7	V8	V9
1.mintavétel	178	0	3149	3645	3072	1978	2874	2147
2.mintavétel	0	0	2789	3495	2890	1774	2469	1975
3.mintavétel	0	0	1987	2780	2456	1510	1940	1320
4.mintavétel	0	0	1690	1865	1945	1156	1285	1002
5.mintavétel	0	0	1580	1912	1150	870	1205	997

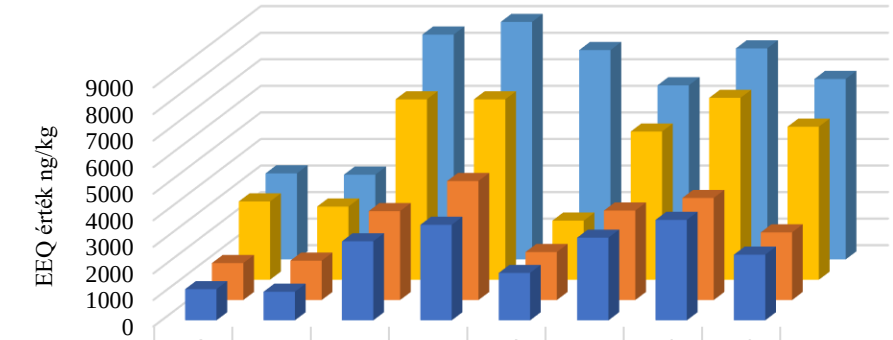
14. Ábra: A vizsgált területek talajainak EEQ értékei (SD<8%; ng/kg légszáraz talajra vonatkoztatva, K3 és K4 – kontroll terület, T4 és T5 – istállótrágyával kezelt terület, V6-V9 – hígtrágyával kezelt terület)

Az istállótrágyázott területek közül a T5, míg a hígtrágyázott területek közül a V6 és V8 területekre történt a legnagyobb mennyiségű szervestrágya kijuttatás. A talajminták eredményei is megerősítik ezt a tényt, ugyanis ezeken a területeken voltak a legmagasabbak az EEQ értékek. Szervestrágya kijuttatás

szempontjából a V7-es területre került a legkevesebb mennyiség. A talajminták eredményei ezt a tényt szintén megerősítik.

4.1.4.2. A kukorica gyökerének eredményei

A növényminták gyökerében a kontroll növényeknél 1075-től 3240 ng/kg-ig terjedő ösztrogénkoncentrációt mértünk. Az istállótrágyázott területeken 2974-től egészen 8940 ng/kg-ig terjedő értékeket kaptunk (15. ábra). Hasonlóan, mint az olaszperje esetében az istállótrágyázott területeken minden alkalommal magasabb ösztrogénhatást mértünk, mint a hígtrágyázott területeken.



	K3	K4	T4	T5	V6	V7	V8	V9
1.mintavétel	1173	1075	2974	3595	1782	3110	3780	2470
2.mintavétel	1390	1480	3346	4478	1806	3368	3840	2547
3.mintavétel	2946	2754	6790	6790	2224	5578	6846	5760
4.mintavétel	3240	3190	8465	8940	7880	6554	7945	6794

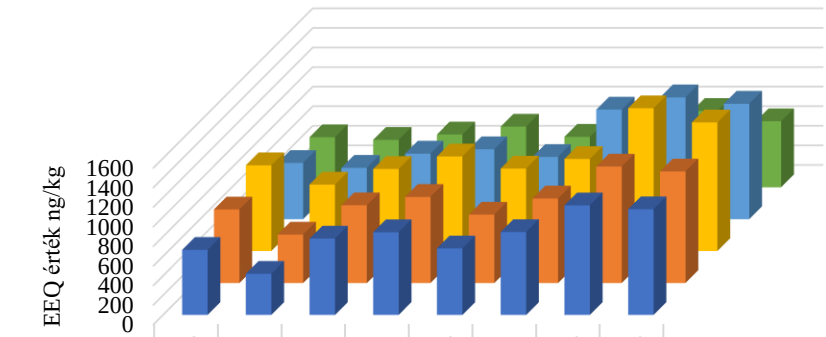
15. Ábra: A kukorica gyökerének EEQ értéke (SD<11%; ng/kg szárazanyag, K3 és K4 – kontroll terület, T4 és T5 – istállótrágyával kezelt terület, V6-V9 – hígtrágyával kezelt terület)

A 3. mintavételtől ugrásszerű emelkedés figyelhető meg a kukorica gyökerének EEQ értékeiben, több esetben megduplázódott az EEQ szint.

A 3. mintavétel során a kukorica már elérte 1,5 méteres magasságot, ebben az időszakban rendkívül gyorsan fejlődik a növény.

4.1.4.3. A kukorica hajtás és szemtermés eredményei

A kukorica hajtás EEQ értékei a hígtrágyázott területek esetében voltak a legmagasabbak, 680-tól 1245 ng/kg értékeket mértünk. Ezt követte az istállótrágyázott terület, de a kontroll területeken mért ösztrogénhatás is magasnak mondható, bár a trágyázott területekről gyűjtött növénymintáknál jóval alacsonyabb (16. ábra).



	K3	K4	T4	T5	V6	V7	V8	V9
1.mintavétel	665	420	780	845	680	847	1120	1080
2.mintavétel	752	495	795	880	699	864	1190	1140
3.mintavétel	877	680	840	967	843	941	1460	1315
4.mintavétel	575	525	670	715	636	1120	1245	1180
szemtermés	512	485	540	620	516	590	780	675

16. Ábra: A kukorica hajtás és szemtermés EEQ értéke (SD<12%; ng/kg szárazanyag, K3 és K4 – kontroll terület, T4 és T5 – istállótrágyával kezelt terület, V6-V9 – hígtrágyával kezelt terület)

A kukorica szemtermés EEQ értékei között nem találtunk szignifikáns összefügést. A kontroll területek értékei nagyon hasonlóak a szervestrágyázott területekről vizsgált kukorica EEQ értékeihez. Viszont

3 hígtrágyázott területnél (V7, V8, V9) magasabb értékeket mértünk, mint a többi terület esetében. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a kukorica gyökerében sokkal nagyobb mértékben raktározódnak az ösztrogénhatású anyagok.

Annak ellenére, hogy a kukorica gyökerében akár 6-8000 ng/kg-os értékeket is mértünk, a hajtás esetében a legmagasabb EEQ értékünk 1460 ng/kg volt. A gyökérrel felvett ösztrogénmennyiségnek tehát csak egy része kerül a növényi hajtásba és a termésbe. Ez megfelel a szakirodalom (Jobling *et al.,* 2009) megállapításainak. Feltételezésünk szerint az emlősök „vér-agy gátjához" hasonló mechanizmus működhet a gyökér és a hajtás csatlakozásánál, mely megszűri a gyökérből a hajtásba átjutó anyagokat.

14. Táblázat: A vizsgált területekről betakarított kukorica mennyisége és EEQ értéke

Terület	Kijuttatott EEQ/ha (g/ha)	Növény EEQ értéke betakarításkor (ng/kg)	Betakarítási takarmány (kg/ha)	EDC (mg/ha)
K3	0	575	39 200	22,5
K4	0	525	31 900	16,8
T4	105,5	670	37 400	25,1
T5	209,4	715	39 500	28,2
V6	122,5	636	38 700	24,6
V7	95,3	1120	32 500	36,4
V8	184,2	1245	43 100	53,7
V9	168,4	1180	43 500	51,3

A kukorica esetében is kiszámoltuk a kapott EEQ értékek és a területekről lekerülő takarmány mennyisége alapján a betárolt EDC

mennyiségét (14. táblázat). A kukorica esetében nincsen akkora különbség a kontroll és a szervestrágyázott területek között, mint az olaszperjénél.

Tömeget tekintve, sokkal nagyobb mennyiség került betárolásra hektáronként, mint az olaszperje esetében, de a növények EEQ értéke alacsonyabb volt. A szervestrágya tartamhatásáról ebben az esetben is beszélhetünk, de sokkal kisebb mértékben, mint az olaszperjénél, ugyanis egy nagyságrenddel nagyobb biomasszatömeg került le a betakarítás során.

A kukorica betakarítása nyár végén, kora ősszel történt, ez az időjárási viszonyoktól és a kukorica érettségi állapotától is függ. A lábon álló kukoricát silózzák, ahol az egyforma szecskaméret mellett a kukoricaszemeket megroppantják a jobb emészthetősége és tápanyagfelszívódása miatt.

A silókukoricát a telepre behordták és a kijelölt silófakkba tömörítették, majd légmentesen lezárták. A tejsavas erjedés után készen állt a tömegtakarmány a tehenek etetésére. A fűszenázshoz hasonlóan, miután megnyitották a silófakkot, 6 alkalommal, különböző helyekről (silófakk eleje, közepe, vége) megmintáztuk és meghatároztuk az EEQ értékét (15. táblázat).

A betakarítás előtt vett hajtásminták EEQ értékei is hasonló eredményeket mutattak, ami azt jelzi, hogy a tejsavas erjedés a kukorica esetében sem befolyásolja az ösztrogének mennyiségét, nem csökkenti azokat, annak ellenére, hogy 2019-ben a betárolást követő 190. napon, 2020-ban pedig 230-on mintáztuk a tárolót.

15. Táblázat: A kukoricaszilázs EEQ értékei a vizsgált években a betárolástól eltelt napok függvényében

Minta megnevezése	Betárolástól eltelt napok száma	EEQ érték (ng/kg), SD
Kukoricaszilázs 2019/1	65	585 ± 10
Kukoricaszilázs 2019/2	105	685 ± 24
Kukoricaszilázs 2019/3	190	620 ± 18
Kukoricaszilázs 2020/1	100	770 ± 11
Kukoricaszilázs 2020/2	155	740 ± 14
Kukoricaszilázs 2020/3	230	710 ± 7

Ying és munkatársai (2003) megállapítása szerint is az EDC vegyületek anaerob környezetben nem bomlanak, de vizsgálataikat jóval rövidebb kísérleti idő alapján (2-81 nap) értékelték ki, mint a miénk.

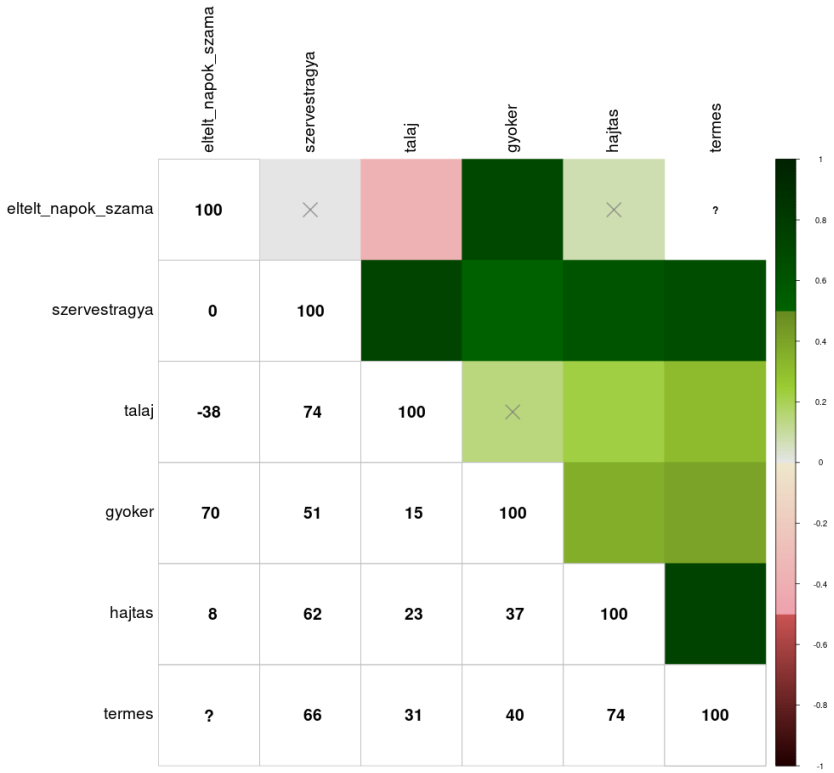
4.1.4.4. Statisztikai értékelés

A korrelációelemzés a különböző komponensek EEQ-értékei között pozitív kapcsolatot tárt fel, mely a marginálisan szignifikáns gyökér-talaj összefüggés kivételével $p<0,05$ szinten szignifikáns 17. ábra). A szervestrágya EEQ-értéke közepes erősségű, erősen szignifikáns ($p<0,001$) korrelációt mutat a vizsgált komponensek EEQ-értékével a következők szerint: talaj – $r=0,74$; gyökér – $r=0,51$; termés – $r=0,66$; hajtás – $r=0,62$. A talaj EEQ-értékének kapcsolata a különböző növényi részek EEQ-értékével gyenge vagy elhanyagolható (gyökér – $r=0,15$, $p=0,066$; hajtás – $r=0,23$, $p<0,01$; termés – $r=0,31$, $p<0,05$).

A növényi részek EEQ-értéke közötti korreláció egyedül a hajtás és termés között közepes ($r=0,74$, $p<0,001$), míg a gyökér-hajtás ($r=0,37$, $p<0,001$) és gyökér-termés ($r=0,40$, $p=0,01$) kapcsolat gyenge.

Elmondható tehát, hogy az olaszperjével ellentétben a kukorica esetén nem rajzolódik ki a hígtrágya-talaj-gyökér-hajtás-termés sorozata a korrelációelemzésből: a két legerősebb kapcsolattól (szervestrágya -talaj, hajtás-termés) eltekintve a korreláció annál erősebb, minél távolabb esik két komponens egymástól e logikai sorban. A szervestrágya kijuttatása után eltelt napok száma a talaj EEQ-érékével negatívan korrelál ($r=-0,38$, $p<0,001$), a növényi részek közül a gyökérrel való kapcsolat a legjelentősebb (gyökér – $r=0,71$, $p<0,001$; semleges korrelációt mutat a hajtás – $r=0,08$, $p=0,346$.

Vagyis a talaj nem mutat akkumulációra utaló jelet, a növényi részek viszont igen, még ha jellemzőbben gyengébbet is, mint az az olaszperje esetén megfigyelhető volt.

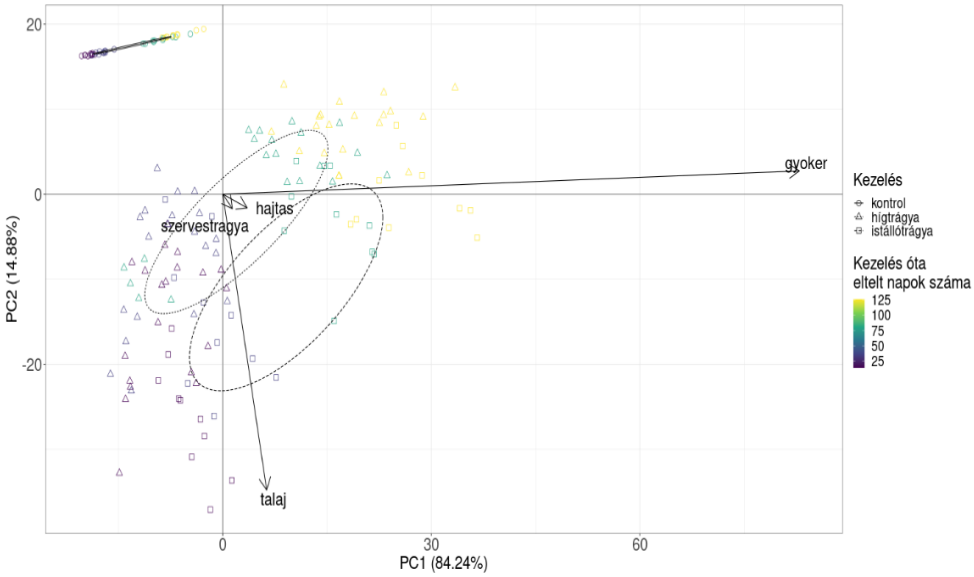


17. Ábra: A kukorica Pearson-féle korrelációja

A kukoricán végzett méréseink főkomponens-elemzése során (18. ábra) a szervestrágya, talaj, gyökér és hajtás EEQ-értéke által kifeszített ordinációs tér még az olaszperjés adatsornál megfigyeltnél is jobban képes volt megragadni az adatokban rejlő varianciát. Az első főkomponens a variancia 84,24%-át, míg az első két főkomponens együtt a 99,12%-át magyarázza. Tanulmányozásra, majd következtetések levonására alkalmas az adatpontok és változók első két főkomponense által meghatározott ordinációs sík. Az olaszperjéhez hasonlóan a kukoricánál is teljesen elkülönül a kontroll a kezelt pontoktól, továbbá a kezelések is jórészt elkülönülnek egymástól.

A kezeléseknek már az olaszperjénél megismert sorozatával (kontroll – hígtrágyával kezelt – istállótrágyával kezelt) leginkább a talajban mért EEQ-érték áll pozitív kapcsolatban. A gyökér EEQ-értéke erre merőleges, így kevéssé alkalmas a kezelések elkülönítésére. A szervestrágya és a hajtás EEQ-értéke az ordinációs síkkal nem párhuzamos, lényegileg nem játszik szerepet az adatpontok elhelyezkedésének meghatározásában. A kontrollpontok mutatják a legkisebb varianciát, melynél a hígtrágyával és az istállótrágyával kezelt pontok varianciája lényegesen nagyobb (e két csoport varianciájának nagysága és iránya közel azonos).

A pontok varianciáját leginkább a kezelés/első mérés óta eltelt napok száma, illetve a talaj EEQ értéke adja. Az eltelt napok számával a gyökér EEQ-értéke mutat pozitív kapcsolatot, összhangban a korrelációelemzés eredményével.



18. Ábra: A kukorica PCA modellezése

4.1.5 Következtetések az élesztőteszt eredményeihez

Az intenzív állattartó telepekről kikerülő hígtrágya értékes tápanyagokat tartalmaz, de a benne található több veszélyes anyag miatt (hormonok, gyógyszerek, tisztítószerek) felhasználása nagyobb odafigyelést igényel.

Vizsgálataink során meghatároztuk a hígtrágya ösztrogénhatását egy intenzív tejelő szarvasmarhatelepen. A hígtrágya útját nyomonkövetve figyeltük a talajra és növényekre gyakorolt hatását, ill. az EDC vegyületek szintjének alakulását. Szeretnénk felhívni a figyelmet a potenciálisan káros ösztrogének táplálékláncon keresztüli felhalmozódásának veszélyére.

Kutatásunkból levont következtetések:

Az intenzív állattartó telepek szervestrágyája az ösztrogénszennyezések fő forrása. A természetes szteroid ösztrogének valamennyi tagja kimutatható mennyiségben található meg a szervestrágyában.

A szervestrágya kijuttatása során a talaj pufferhatása érvényesül: mind a tápanyagokból, mind a potenciális szennyezőkből bizonyos mennyiség raktározódik, mely a későbbiekben tartamhatásként érvényesülhet, bizonyos mennyiséget a növények vesznek fel, és egy része pedig a mélyebb talajrétegekbe és a talajvízbe tud bemosódni. Mind a talaj, mind a fejtrágyaként kijuttatott N-műtrágya mésztartalma növeli a pufferkapacitást, ellaposítva ezzel az ösztrogénszintet leíró görbét.

A növények szintetizálják a fitoösztrogéneket, de aktív és passzív módon is képesek felvenni exogén eredetű ösztrogéneket. Az ösztrogének hidrofób és lipofil tulajdonságai viszonylag könnyű átjutást biztosítanak a

növényi membránokon. A növények képesek elraktározni az ösztrogéneket a gyökerükben, hajtásukban és a termésben is. Feltételezzük egy mechanizmus létezését, amely a gyökérből a káros anyagoknak csak egy részét engedi át a hajtás felé (a „vér-agy gát” -hoz hasonlóan).

Abból a szempontból is vizsgáltuk a növényeket, hogy az EDC vegyületek felvétele okoz-e fejlődési rendellenességet. Semmilyen látható tünetet, fejlődési rendellenességet nem tapasztaltunk a növényi kultúrákban.

Ennek ellenére a táplálékláncba is bekerülhetnek az EDC vegyületek olyan mennyiségben, amely már aggodalomra adhat okot.

4.2 *In vivo* Zebradánió teszt eredményei

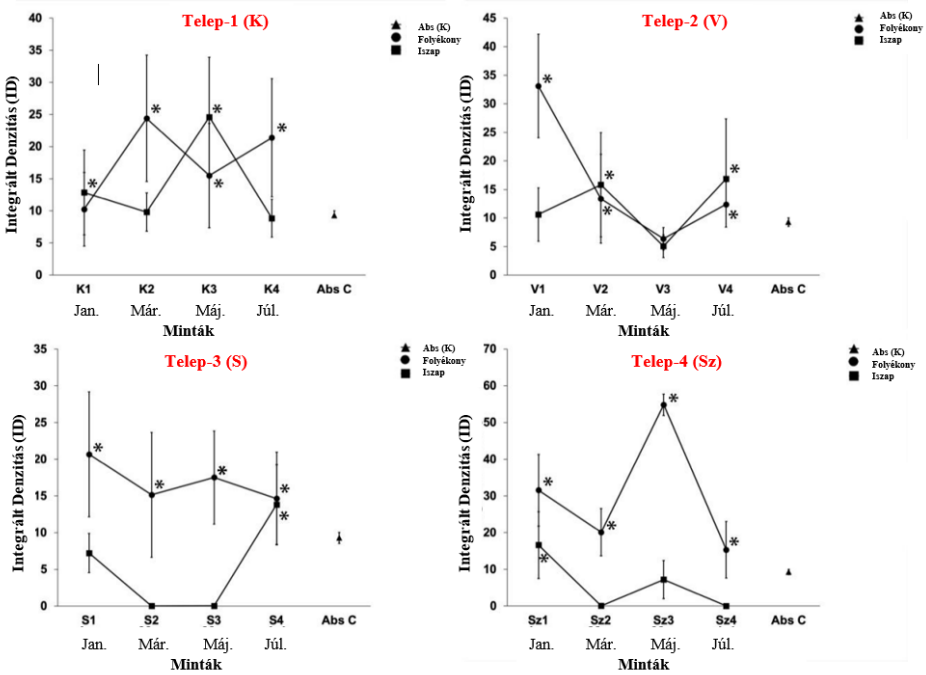
Most rátérnék az *in vivo* kiegészítő ösztrogénhatás vizsgálat során kapott eredményekre, melyet a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkacsoportjával közösen végeztünk, Dr. Csenki-Bakos Zsolt vezetésével. A témában azt részletesen feldolgozó doktori disszertáció is készült, ezért jelen értekezésben csak kiegészítő vizsgálatként szerepel. A kutatócsoport már több közös publikációt jelentetett meg (lásd publikációs jegyzék).

Fontosnak tartottuk, hogy a mintáink ösztrogénhatását élő szervezeten is leteszteljük, így teljes képet kapva azok hatásáról.

4.2.1. A mikroinjektáláson alapuló halembriótesztek eredményei

A halvizsgálatokhoz 4 különböző helyről gyűjtött folyékony és üledékfázisú iszapmintát vizsgáltunk transzgénikus zebradánió embriókon a kidolgozott mikroinjektálás és értékelési protokoll szerint. Általánosságban elmondható, hogy az összes vizsgált hígtrágyaminta

esetében a túlélő lárvák száma elegendő volt az ösztrogénhatás meghatározásához. A transzgénikus halmodell segítségével ösztrogén pozitív mintákat találtunk mind folyékony, mind az iszap fázisban is (19. ábra).



19. Ábra: Az integrált denzitás (ID) értékek a Tg(vtg1:mCherry) transzgenikus zebradánió lárvák májában lévő fluoreszcens jelek intenzitásából származnak négy tejelő szarvasmarha telepről vett hígtrágya minta mikroinjektálása után. A nagy szórás miatt az ID értékeket egy cut-off képlet segítségével értékeltük ki. A 32 vizsgált minta eredményei alapján összesen 20 minta mutatott ösztrogén hatást hallárvákban. Az ösztrogén pozitív minták csillaggal vannak jelölve.

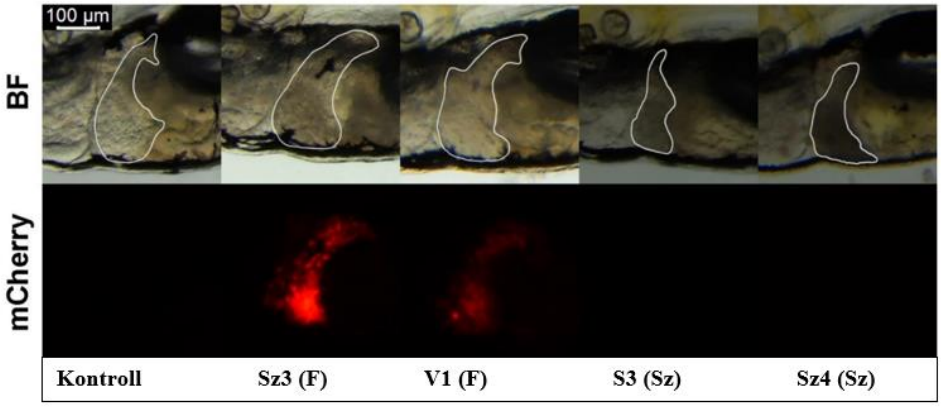
Az élesztő és halteszt eredményei között 62,5%-os egyezés mutatkozott, ami a minták ösztrogénhatását jelzi. A 32 vizsgált mintából összesen 12 minta nem mutatott ösztrogénhatást a halembrió vizsgálatok során, az integrált denzitás (ID) értékek alapján. A folyékony fázisból a K és a V helyű minták közül csak egy nem volt ösztrogén hatású (K1 és V3 minták). A K1, K3, S4, V2, V4 és SZ1 üledékfázisú minták azonban ösztrogén hatásúak voltak. Az ID értékek nagy eltéréseket mutatnak az egyes kezeléseken belül, és a fent említett egyéni érzékenységi különbségek a hígtrágya esetében sokkal jelentősebbek voltak az egyes hatóanyagokhoz képest.

Az általánosan használt statisztikai módszerek a nagy szórások miatt nem tűntek alkalmasnak az ösztrogenitás meghatározására. Ezért az adatokat először a Kruskal-Wallis analízissel értékeltük ki Dunn többszörös összehasonlító tesztjével, de annak ellenére, hogy a kezelt embriók közül sok vizuálisan megfigyelhető volt, és egyértelmű fluoreszcenciát mutatott a májban, a teszt negatív eredményt adott több esetben is. A cut-off képlet (Classen *et al.,* 1987; Lardeux *et al.,* 2016) sokkal alkalmasabbnak tűnt az eredmények értékelésére, mivel ebben az esetben az ösztrogenitás összhangban van a vizuálisan megfigyelt fluoreszcenciával.

Az eredményeket tovább vizsgálva látható, hogy egyes minták esetében a kapott ID-értékek alacsonyabbak voltak, mint a kontroll integrált sűrűségeredmények (9,274±0,7403). Explicit csökkenés csak az üledékminták esetében volt megfigyelhető (S2: 0,02429±0,01991; S3: 0,03094±0,02778; SZ2: 0,06967±0,07831; SZ4: 0,06502±0,085). Az embriók vitellogenin termelését a máj fejlődési stádiuma és szerkezeti

integritása határozta meg (Bakos *et al.*, 2019; Csenki *et al.*, 2020; Faisal *et al.*, 2020).

Az embriók májáról készült reprezentatív képek egyértelműen azt mutatják, hogy azokban az esetekben, ahol az integrált denzitás értékek lényegesen alacsonyabbak voltak, a máj alakja és mérete eltért a kontrollétól, ami arra utal, hogy a máj érzékeny az expozícióra (20. ábra). A máj méretének csökkenése a májgyulladás, degeneráció és nekrózis következménye lehet, amit a máj jellegzetes színváltozása is igazol (He *et al.*, 2013; Wolf és Wheeler, 2018; Zhang *et al.*, 2016). Ezek a hatások csökkenthetik a fluoreszcenciát, ennek ellenére a minta ösztrogén hatású lehet. A módszer viszonylag új, és a továbbfejlesztése során érdemes figyelembe venni az embriók vegyszerekkel szemben mutatott rendkívüli érzékenységet.



20. Ábra: Reprezentatív Bright Field (BF) és fluoreszcens (mCherry) képek a kezelt Tg(vtg1:mCherry) zebradánió lárvák májából. A fehér vonallal jelölt máj méretének, színének és alakjának jelentős változásai a kontrollhoz képest azt mutatják, hogy azokban az

esetekben, amikor nem volt megfigyelhető fluoreszcens aktivitás, az injektált minta májkárosodást okozott.

Azokban a mintákban, ahol szignifikáns fluoreszcens jelet észleltünk, az embriók mája nem mutatott számottevő eltérést a kontrollhoz képest, így feltételezhető, hogy ezek a minták alacsony toxicitást mutattak az embriókra nézve. Több tanulmány is kimutatta, hogy a vízi környezetekben történt ösztrogénszennyezés aggodalomra ad okot, mivel károsan befolyásolhatja a vízi vadon élő állatok, köztük a halak szaporodásbiológiáját (Brion *et al.,* 2004; Hanselman *et al.,* 2003; Leet *et al.,* 2011; Mills és Chichester, 2005; Sumpter, 2005).

A környezetbe kerülő trágya valódi ösztrogén hatását több tényező befolyásolja, pl. az ösztrogén vegyületek relatív aránya és mennyisége, a vegyszerek vízben való oldhatósága és felezési ideje, a mikroorganizmusok biotranszformációja és biológiai lebomlása, kölcsönhatások más EDC vegyületekkel, a talaj és a víztestek tulajdonságai, a környezeti és éghajlati viszonyok, fény intenzitás, oxigén szint stb. (Adeel *et al.,* 2017; Biswas *et al.,* 2013; Ma *et al.,* 2016). Emellett számos egyéb vegyületet is tartalmaz, amelyek nem feltétlenül bírnak hormonális hatással, azonban toxikus hatásaik révén a vitellogenin-termelést is befolyásolhatják, amit az eredményeink is bizonyítanak. Összefoglalva, a Tg(vtg1: mCherry) embriókra kifejlesztett mikroinjektálási módszer alkalmas folyékony és üledék minták ösztrogén hatásának vizsgálatára. Az oldószercsere után az YES tesztekhez készített kivonatok alkalmasak voltak az injektálási kísérletekhez, így azonos feltárásokból készültek a vizsgálatok.

Az embrió teszt egyértelműen igen/nem választ adott a minta ösztrogén hatására, azonban a teszt időtartama szignifikánsan hosszabb volt, mint a YES teszté. A két módszer együttes alkalmazása rendkívül hatékony szűrési megközelítést biztosít, ahol a gyors YES teszt eredményeit az új *in vivo* vizsgálati módszer értékes adataival egészíthetjük ki, lehetővé téve a minták ösztrogénhatásának és toxicitásának komplexebb kiértékelését.

4.2.2. Következtetés a zebradánió tesztekhez

Az állattartó telepekről származó melléktermékek, beleértve a szervestrágyát is, az egyik legjelentősebb ösztrogén szennyező forrás a környezetben. Ezek a melléktermékek összetett mátrixokkal rendelkeznek, ezért kiegészítő *in vivo* és *in vitro* tesztekre van szükség valódi ösztrogén hatásuk vizsgálatához.

A transzgenikus modellek rendkívül előnyösek lehetnek, ezért ebben a vizsgálatban egy *in vivo* és egy *in vitro* transzgenikus modellt alkalmaztunk négy, eltérő tulajdonságokkal rendelkező tejelő szarvasmarha telep trágyamintáinak vizsgálatára. A két vizsgálati módszerrel meghatároztuk a minták ösztrogenitását, valamint feltártuk a két modell kombinálhatóságát. Az első *in vitro* teszteket klasszikus YES teszttel végeztük, genetikailag módosított *Saccharomyces cerevisiae* modell segítségével.

A YES teszt eredményei alapján új vizsgálati módszert dolgoztunk ki egy Tg(vtg1: mCherry) transzgénikus zebradánió embriómodellhez, ahol az expozíciót mikroinjektálással végeztük a hipoxia másodlagos tüneteinek kiküszöbölésére, amelyek normál vizes expozíció során jelentkezhetnek szerves anyagot tartalmazó kivonatok jelenlétében. A

YES teszt során az összes minta pozitív lett, függetlenül attól, hogy a minta folyékony vagy üledékes fázisból származik.

A YES teszttel kimutatott EEQ értékek a szakirodalommal összhangban olyan nagyságrendeket jeleztek, amelyek már potenciális környezeti kockázatot jelenthetnek.

Az embriók nagy érzékenysége miatt a halteszt a YES teszttel ellentétben elsősorban csak igen-nem válaszokat tudott adni az ösztrogén hatás kimutatásakor. Komplex szervezetként azonban alkalmas volt a minták szubletális toxicitásának, elsősorban a hepatotoxicitás kimutatására is, kiegészítve a YES teszt eredményeit. Összefoglalva, a két módszer együttes használata hozzásegíthet a biztonságos hígtrágyaalapú vízhasznosításhoz, annak kezeléséhez és a környezetvédelemhez.

4.3. Analitikai tesztek eredményei

4.3.1. A hígtrágyaminták analitikai eredményei

Vizsgálataink során 5 db szteroid ösztrogént (E1, 17β-E2, 17α-E2, 17α-EE2, E3), 3 db ivarzásindukáló hormonkészítmény-hatóanyagot (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol, dinoproszt-trometamin) és 2 db kísérővegyületet (klórkrezol, benzil-alkohol) vizsgáltunk UHPLC méréssel a hígtrágyából.

32 db hígtrágyamintát vizsgáltunk meg Ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia - fluorescens detektor (UHPLC-FLD) módszerrel. Az összes mintánkból kimutatható volt legalább egy az ösztrogéncsoportba tartozó vegyület, melynek értékeit a 4. számú melléklet tartalmazza. Az ivarzásindukáló gyógyszerek közül (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) és a vizsgált kísérőanyagok (klórkrezol, benzil-alkohol) a kimutatási határ alatt volt az összes minta esetében. E3-mat a minták 100% tartalmazott,

17α-E2-t a minták 78%-a, míg 17β-E2-t a minták 66%-ból tudtunk kimutatni. E1 és 17α-EE2 a kimutatási határ alatt volt.

Jobling és munkatársai (2009) kimutatták, hogy a kémiai analitikai mérések és az élesztőteszt során kapott ösztrogénaktivitás (EEQ) nem korrelál jól az egyes szteroid ösztrogének mért analitikai koncentrációival (Jobling *et al.*, 2009). Bár vizsgálataink során közvetlen összefüggést mi sem találtunk, azonban bizonyos tendenciák megfigyelhetők: a YES teszt eredményei alapján növekvő tendencia bontakozott ki 2017-től 2020-ig. Ezt a növekvő tendenciát az analitikai mérések során is megfigyeltük. Magyarázatként az szolgál, hogy 2018 második felében történt szaporítási protokollváltás a telepen, melynek következtében nagyobb mennyiségben alkalmaztak ivarzásindukáló gyógyszereket.

Az analitikai mérések eredményeiből szembetűnik (4. sz. melléklet), hogy a 2018-as év második felétől volt kimutatási határ felett a 17β-E2 és a 17α-E2 is ettől az időponttól folyamatosan előfordult a mintákban. Az E3 értékei nagy szórást mutatnak az évek és negyedévek során.

A hígtrágya iszap frakciójához minden esetben magasabb értékek tartoztak: a 17β-E2 jellemzően hat-hétszer magasabb koncentrációban van jelen, mint a folyékony frakcióban.

4.3.2. Az olaszperje analitikai eredményei

A mérésekhez a YES teszthez előkészített, majd membránszűrőn átszűrt mintákat használtuk fel.

4.3.2.1. Talajminták eredményei

Az UHPLC mérés eredményei E1 és 17α-EE2 mindkét kontroll és valamennyi minta esetében a kimutatási határ alatt voltak. Az α-E2 jellemzően kimutatási határ alatt volt, mindössze néhány véletlenszerű kivétellel. β-E2-t az istállótrágyázott területek valamennyi mintájából ki

tudtunk mutatni 0,9 és 1,6 µg/kg értékhatárok között, melyeket a 5. számú melléklet tartalmaz. A hígtrágyázott területeken vagy kimutatási határ vagy 1 µg/kg alatt volt a β-E2 értéke. A kontroll területek esetében az E3 kimutatási határ alatt volt, de valamennyi kezelt terület valamennyi mintavétel során értékelhető eredményt adott. Legmagasabb értéke a legnagyobb mértékben istállótrágyázott terület (T3) volt valamennyi minta esetében (a magas E2 értékhez a terület alacsony mésztartalma is hozzájárulhatott, lásd 7. táblázat). Jellemző tendencia, hogy egy közepesen magas értékről (1.mintavétel) az E3-értékek alacsonyabb értékre csökkennek, majd a tenyészidőszak végére ismét emelkedésnek indulnak.

4.3.2.2. Gyökérminták eredményei

Az UHPLC mérés eredményei E1, 17α-E2 és 17α-EE2 mindkét kontroll és valamennyi minta esetében a kimutatási határ alatt voltak. A β-E2 értékei a legtöbb esetben szintén kimutatási határ alatt voltak, de a tenyészidőszak vége felé (istállótrágyázott területeken 3-4. mintavétel, hígtrágyázott területeken 4. mintavétel) alacsony, de értékelhető eredményt kaptunk, melyeket az 6. számú melléklet tartalmaz. Az istállótrágyázott területek eredményei minden esetben alacsonyabbak voltak. Valószínű ok, hogy a növény csak a tenyészidő végére akkumulált olyan mennyiséget, hogy az meghaladja a kimutatási határt. E3 esetében a kezelt területeken mindig csak az utolsó vagy utolsó két mintavétel adott értékelhető eredményt jelezvén a növényi akkumulációt, mely csak a tenyészidőszak végére érte el a kimutatási határ feletti értéket.

4.3.2.3. Hajtásminták eredményei

Az UHPLC mérés eredményei E1, α-E2 és 17α-EE2 mindkét kontroll és valamennyi minta esetében a kimutatási határ alatt voltak. A β-

E2 értékei a kontroll mintákban kimutatási határ alatt voltak, a kezelt területeken valamennyi mintavétel értékelhető eredményt adott. A tendenciák a következők: az első két mintavétel esetében valamennyi hígtrágyázott terület 1 µg/kg körüli vagy inkább alatti β-E2 értéket mutatott, míg az istállótrágyázott két terület mintái jóval e feletti (1,7 µg/kg) értéket mutattak. A különbség a 3. mintavételre csökkent, a 4. mintavételre pedig eltűnt és a hígtrágyázott terület β-E2 értéke legalább utolérte vagy meghaladta az istállótrágyázott terület β-E2 értékét, melyet a 7. számú mellékletben láthatunk. (A YES teszt még ennél is nagyobb arányú növekedést mutat). E3 esetében valamennyi mintaterület első vagy első két mintavétele kimutatási határ alatt volt, azonban a 3. és 4. mintavétel minden esetben értékelhető eredményt adott, méghozzá jelentősen növekvő tendenciát mutatva minden esetben.

4.3.2.4. Fűszenázs eredményei

A 2020-as vizsgálatok szerint az erjesztett fűszenázs magas (19 µg/kg) 17β-E2 tartalmú volt. Alacsonyabb értékkel, de a 17α-E2 és E3-at is ki tudtuk mutatni (4,2 ill. 4 µg/kg), E1-et is sikerült kimutatni. A 2019-es vizsgálatokra is egyértelműen a 17β-E2 dominált, míg a többi vegyületre random eredményt kaptunk (11. sz. melléklet).

4.3.3. A kukorica analitikai eredményei

A mérésekre a YES teszthez előkészített, majd membránszűrőn átszűrt mintákat használtuk fel.

4.3.3.1. Talajminták eredményei

Az UHPLC mérés eredményei E1 és 17α-EE2 mindkét kontroll és valamennyi minta esetében a kimutatási határ alatt voltak. A 17α-E2-re

jellemzően az első vagy második mintavételnél kaptunk értékelhető eredményt, bár nagyon alacsony értékben. A többi mérésnél kimutatási határ alatt voltak az eredmények (8. sz. melléklet). Ez azt feltételezi, hogy vagy a kultúrnövény veszi fel, vagy pedig a talaj kémiai és biológiai folyamatai átalakítják. Ugyanez a tendencia figyelhető meg a 17β-E2 esetében: az első két mintavételre kapott közepes vagy alacsony értékek, a 3-4. mintavételre a kimutatási határ közelébe, vagy akár az alá csökkennek. Az E3 esetében is egy magas kezdeti értékről istállótrágyázott területeken közepes, míg hígtrágyázott területeken alacsony értékre csökken.

4.3.3.2. Gyökérminták eredményei

Az UHPLC mérés eredményei E1, 17α-E2 és 17α-EE2 mindkét kontroll és valamennyi minta esetében a kimutatási határ alatt voltak. A 17β-E2 esetében az istállótrágyázott területek 1. mintavétele, a hígtrágyázott területek 1-2 mintavétele 1 µg/kg alatti értékeket adott. A növényi akkumulációt jelzi, hogy a 2. és 3. mintavételt követően ugrásszerűen megnőnek az eredmények (9. sz. melléklet). Erre a folyamatra a nitrogén fejtrágyázás minden bizonnyal hatással van, hiszen az eredmények emelkedése ezt követően indult meg. Hasonló tendencia figyelhető meg az E3 esetében magasabb számértékekkel.

4.3.3.3. Hajtásminták eredményei

Az UHPLC mérés eredményei E1, 17α-E2 és 17α-EE2 mindkét kontroll és valamennyi minta esetében a kimutatási határ alatt voltak. A 17β-E2-re nem minden minta esetében kaptunk értékelhető eredményt, minden esetben 1 µg/kg alatti, több esetben kimutatási határ alatti szintet mértünk, melyekből tendenciát nem tudtunk értelmezni. Az E3 esetében

alacsony értékeket kaptunk, azzal a tendenciával, hogy az értékek az 1. és 2. mintavétel között alig változtak, alacsonyak voltak (10.sz. melléklet). A nitrogénfejtrágyázás után azonban ugrásszerűen emelkedtek, ezért a 3. mintavétel értékei mintegy dupláját mutatják, mint a 2. mintavételnél. Később a növekedés üteme csökken, a szemtermésben jellemzően nagyon alacsony értékek vannak a kimutatási határ közelében.

4.3.3.4. Termés (szemtermés és kukoricaszilázs)

A kukoricaszem esetében mind 2019-ben és 2020-ban is csak az E3-t tudtuk kimutatni a vizsgált vegyületek közül (istállótrágyával kezelt terület estében 0,3 µg/kg értéket, míg hígtrágyával kezelt területeken 0,1 és 0,3 µg/kg közötti értékeket mértünk, (10. sz. melléklet)). A többi vegyületre kimutatási határ alatti értékeket kaptunk. Kukoricaszilázs esetében mind 2019-ben és 2020-ban a 17β-E2 dominált, viszonylag magas (7,6 és 10,8 µg/kg) értékkel. 17α-E2-re közepes (1,7 és 2,2 µg/kg) kaptunk. A többi vegyület kimutatási határ alatt volt (11. sz. melléklet).

4.3.4. Következtetések az analitikai mérésekhez

Az UHPLC-vizsgálatok során az ivarzásindukáló gyógyszereknek sem a hatóanyagait, sem a segédanyagait nem tudtuk kimutatni, valamennyi a kimutatási határ alatt volt. Ez azt jelzi, hogy a beinjektált anyagok mindegyike metabolizálódik, direkt módon egyik sem jelenik meg a hígtrágyában. Erre utal az a tény is, hogy egy tipikus metabolit (E3), valamennyi mintából kimutatható volt.

Az ivarzás minél nagyobb mértékű programozása érdekében a telepen megduplázták a felhasznált hormoninjekciók mennyiségét. Ez, mint tendencia, a hígtrágya minták vizsgálata során kimutatható volt.

A növényminták esetében, biológiai minták lévén, kevésbé az egzakt számértékek, sokkal inkább a tendenciák a relevánsak. Jellemző tendencia, hogy a kijuttatott trágya EDC-tartalma csökkenő tendenciával átkerül a növénybe, és ez egészen a tavaszi N-fejtrágyázásig tart. Ekkor mérhetők a legalacsonyabb értékek. A fejtrágyázás hatására jelentős növekedés indul meg, melynek során az EDC vegyületek felhalmozása/termelése (fitoösztrogének) jelentősen megnő.

4.4. Toxikológiai tesztek eredményei

A toxikológiai vizsgálatok során 4 tesztszervezet (baktériumok, kisrákfélék, alga és növényi magvak) segítségével határoztuk meg a hígtrágya toxikus hatását. Külön vizsgáltuk a szeparált és a nem szeparált hígtrágya hatását a kiválasztott tesztszervezetekre.

4.4.1. Toxikológiai eredmények kezeletlen hígtrágyával (szeparátor használata nélkül)

A kezeletlen hígtrágya EEQ értéke 390 ± 40 ng/l volt. Az általunk vizsgált hígtrágya tápanyagtartalmát tekintve átlagosnak mondható. Szeparátor használata előtt a hígtrágya jellemzői a következők voltak: szárazanyag tartalom: 20 g/l; pH: 7,15; összes nitrogéntartalom: 0,98 g/l; ammónium-nitrogén: 0,25 g/l; nitrit-nitrát-nitrogén: 0,50 g/l; foszfor: 0,23 g/l; kálium: 0,63 g/l.

Minden toxikológiai tesztet hígítatlan, 10x, 50x, 100x, és 500x-os hígítással végeztünk. A toxikológiai vizsgálatokhoz csak a nyári időszakból származó mintákat gyűjtöttünk, ugyanis ebben az időszakban locsolják a hígtrágya legnagyobb mennyiségét a szántóföldekre.

A két talajbaktérium és a *Daphnia* akut teszt mindegyike érvényesnek tekinthető, mivel a kontroll *Daphnia*-teszt esetén az immobilizáció 10% alatti (0%) volt, és a kálium-dikromát 24 órás EC_{50} értéke a 0,6 mg/l és 2,1 mg/l (1,56 mg/l) tartományon belül volt. A talajtoxicitási vizsgálatok során a pozitív kontroll (10 mg/l rézoldat) teljes gátlást mutatott, a negatív kontroll pedig szaporodást. Ebben a három tesztben nem mutatott a hígtrágya semmilyen negatív hatást a tesztszervezetekre.

Az alganövekedés-gátlási teszteket is érvényesnek tekintettük. A 72 órás tesztidőszak után a kontrollban a biomassza 27×-es növekedést mutatott, a pH értéke a különböző hígításokban nem változott 1,5-nél nagyobb mértékben a tesztidőszak alatt. Az alganövekedés-gátló teszttel végzett előzetes tesztelés azt mutatta, hogy a felhasznált hígítások (10 ×, 50 ×, 100 × és 500 ×) nem alkalmasak további számításokra, mert a hígítatlan, eredeti minta és a következő hígítás (10 ×) közötti különbségek kivételesen magasak voltak.

A növekedésgátlás a hígítatlan folyékony hígtrágyában 93%, míg a 10-szeres hígításban csak 5% volt (ez nem tekinthető valódi gátlásnak). A fenti okok miatt a 2×-es, 4×-es, 6×-os és 8×-os hígításokat teszteltük. A hígítatlan szuszpenzióban 93%-os gátlás volt tapasztalható, a 4×-es hígítás 67%-os gátlást mutatott, a 10×-es hígítás pedig hasonló eredményeket adott, mint a kontrollminta. A számított ED_{10} érték 9,3x hígításnál volt, a 95%-os alsó konfidenciahatár 37,7; a 95%-os felső konfidenciahatár 6,1. A számított ED_{50} érték 4,1x hígításnál volt, 95%-os alsó konfidenciahatár 6,3; 95%-os felső konfidenciahatár 2,2.

A fitotoxicitási tesztek során a magok elérték a 70%-os csírázási arányt és a gyökér növekedése a kontroll lemezeken elérte a 30 mm-es növekedést, így a teszteket érvényesnek tekintettük. A hígítatlan hígtrágya felhasználásával 14-45%-os gátlást mértünk a fehér mustár, kerti zsázsa, hajdina és tritikálé esetében. A 10×-es hígítások majdnem ugyanazt az eredményt adták, mint a hígítatlan minta. A fehér mustár, kerti zsázsa és hajdina 50×-es hígításai, valamint a tritikálé 100×-os hígításai adtak negatív eredményt. A cirok nem volt érzékeny, és a hígítatlan hígtrágya egyenesen serkentette ennek a növénynek a növekedését (30%-os stimuláció) (14. táblázat). Ez arra enged következtetni, hogy azokat a területeket, ahová rendszeresen nagy mennyiségű hígtrágyát juttatnak ki, érdemes első kultúraként cirokkal hasznosítani.

4.4.2. Toxikológiai eredmények kezelt hígtrágyával (szeparátor használata után)

A kezelt hígtrágya EEQ értéke 3 ± 0,3 ng/l. Szeparátor alkalmazása után a hígtrágya beltartalmi értékei a következőképpen változtak: szárazanyag-tartalom: 0,9 g/l; pH: 7,14; összes nitrogéntartalom: 0,39 g/l; ammónium-nitrogén: 0,07 g/l; nitrit-nitrát-nitrogén: 0,30 g/l; foszfor: 0,13 g/l; kálium: 0,41 g/l. Az eredményekből látható, hogy a szeparátor a szárazanyag-tartalmat 95,5%-kal, az összes nitrogéntartalmat 60,2%-kal, az ammónium-nitrogéntartalmat 72,0%-kal, a nitrit-nitrát nitrogéntartalmat 40,0%-kal, a foszfort 43,5%-kal, a káliumtartalmat 35,0%-kal csökkentette.

A *Daphnia* akut immobilizációs teszt és a két talaj-mikrobiológiai teszt hitelesnek tekinthető (lásd fent), melynek során a hígtrágya semmilyen negatív hatást nem gyakorolt a tesztszervezetekre.

Az alga növekedésgátlási teszt, melynek során hígítatlan és hígított hígtrágyát is használtunk, negatív eredményt adott. Hígítatlan hígtrágyával 97,5 %-os értéket kaptunk az alga relatív sejtnövekedésére, amely a 10%-os gátlási szint (ED_{10}) alatt van, mely megfelel a NOEL értékének. A hígítási sorra 2,5%-os gátlást, illetve 3-16 %-os serkentést tapasztaltunk. A 16 %-os serkentés pozitív hatást jelent az algák növekedésére (21. ábra).

A Phytotoxkit mikrobiológiai teszt esetében valamennyi csíráztatási teszt hitelesnek tekinthető (lásd fent). A ciroknál valamennyi hígítás esetében serkentést kaptunk, melynek maximumát, 60 %-os serkentést, a hígítatlan minta adta. A kerti zsázsa esetében 53 %-os, míg a fehér mustár esetében 18 %-os gátlást kaptunk a 10x-es hígítás esetében, de a többi hígítási értéknek sem pozitív, sem negatív hatása nem volt a csírázásra. A többi növény (pohánka, tritikálé) növekedése a kontroll közelében volt, valamennyi hígítás esetében (14. táblázat).

14. Táblázat: Relatív gyökérnövekedés (mm, %) szeparált és nem szeparált hígtrágyamintákban, (kontroll=100%)

Tesztszervezet	**Relatív gyökérnövekedés nem szeparált hígtrágyában**					**Relatív gyökérnövekedés szeparált hígtrágyában**				
	Kontroll	*Hígítatlan*	*10×*	*50×*	*100×*	*Kontroll*	*Hígítatlan*	*10×*	*50×*	*100×*
	átlagos gyökérhossz (mm), növekedési ráta a kontrollhoz képest (%)									
Fehér mustár	44.9 ± 19 mm	36.0 ± 26 mm/ 80%	35.4 ± 24 mm / 79%	45.4 ± 24 mm / 101%	46.0 ± 25 mm / 102%	41.7 ± 22 mm	48.2 ± 20 mm/ 115%	34.3 ± 18 mm/ 82%	41.8 ± 18 mm/ 100%	46.4 ± 24 mm/ 111%
Kerti zsázsa	58.4 ± 27 mm	32.0 ± 16 mm / 55%	37.2 ± 35 mm / 64%	60.3 ± 7 mm / 103%	59.6 ± 15 mm/ 102%	49.8 ± 23 mm	48.8 ± 15 mm/ 98%	28.4 ± 13 mm/ 57%	48.8 ± 19 mm/ 98%	56.0 ± 14 mm/ 112%
Hajdina	68.4 ± 13 mm	56.6 ± 35 mm/ 83%	55.6 ± 44 mm/ 81%	70.6 ± 19 mm/ 103%	60.1 ± 29 mm/ 88%,	69.6 ± 14 mm	65.9 ± 23 mm/ 95%	64.6 ± 15 mm/ 93%	73.85 ± 6 mm/ 106%	67.8 ± 15 mm/ 97%
Cirok	32.5 ± 18 mm	42.7 ± 10 mm/ 131%	29.2 ± 15 mm / 90%	42.1 ± 15 mm / 130%	38.3 ± 16 mm / 118%	32.5 ± 13 mm	52 ± 16 mm/ 160%	41.6 ± 18 mm/ 128%	33.5 ± 15 mm/ 103%	39 ± 12 mm/ 120%
Tritikálé	46.1 ± 19 mm	28.5 ± 13 mm/ 62%	37.1 ± 16 mm/ 80%	34.0 ± 17 mm/ 74%	41.9 ± 15 mm/ 91%	38.4 ± 15 mm	41.4 ± 13 mm/ 108%	44.3 ± 7 mm/ 115%	40.85 ± 12 mm/ 106%	40.3 ± 10 mm/ 105%

4.4.3. Statisztikai értékelés

Összefüggést állapítottunk meg az immobilitásra és növekedési arányokra gyakorolt hatás, valamint az alkalmazott koncentrációk között. A tanulmányhoz az amerikai Környezetvédelmi Ügynökség (US Environmental Protection Agency) Probit programját (verziószám 1,5) használtuk az ED (effective dilution, hatásos hígítás) értékei és ezek 95%-os megbízhatósági intervallumának kiszámításához (EPA1999). Kiszámításra került a hatásos hígítás középértéke (ED_{50}) a *Daphnia* immobilizációs teszt esetében, valamint a 10%-os gátláshoz tartozó hatásos hígítás a baktérium- és algatesztek esetében.

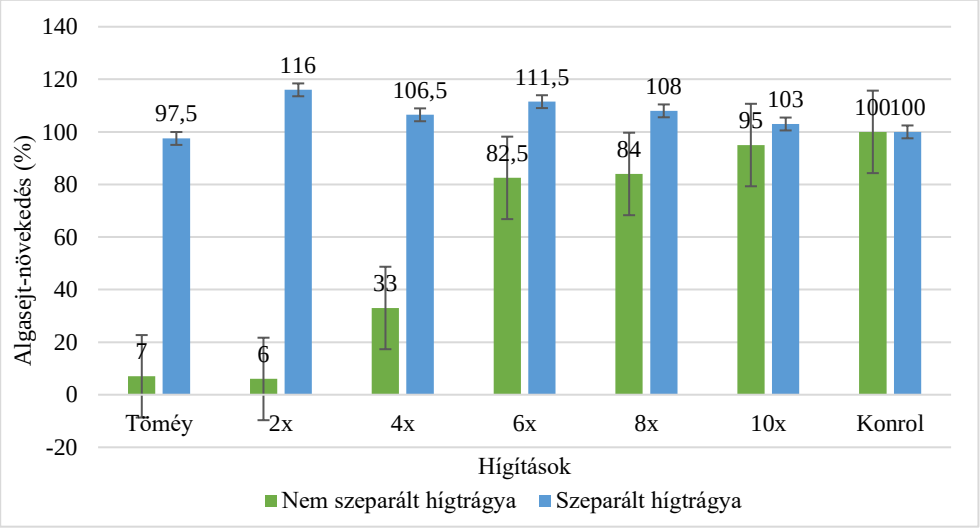
Az ED_{50} érték az adott anyagnak arra a hígítási arányára utal, amely által a kiváltott hatás mértéke éppen félúton van az alap- és a maximális érték között. Ezzel szemben az ED_{10} értéke arra a hígításra utal, amely a vizsgált hatást a tesztorganizmusok 10%-ánál váltja ki az expozíciós idő után. A Phytotoxkit mikrobiológiai tesztek esetében a hatástalan hígítás értékeit (még nem-észlelhető hatáshoz tartozó koncentráció, no-effect level, NOEL) szintén megadtuk. A NOEL értéke a hígtrágya azon legmagasabb dózisa vagy koncentrációja, amely még nem okoz észlelhető toxikus tüneteket a tesztnövényeken (ISO 8692, ISO 6341, MicroBioTest 2018).

4.4.4. Következtetések a toxikológiai vizsgálatokhoz

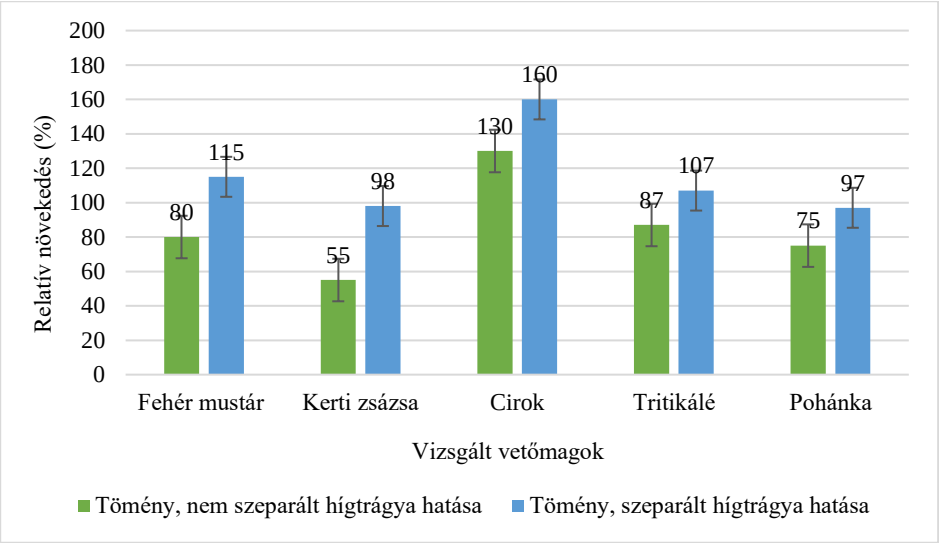
A toxikológiai vizsgálatok jól tükrözik a hígtrágya környezetre gyakorolt hatását. A különböző tesztszervezetek pedig egy átlátható képed adnak a kezelések hatásairól. A cirok kivételével minden növény körülbelül 25%-os csírázásgátlást mutatott a szeparálás nélküli hígtrágyában. Egyik hígítás sem adott 50%-nál nagyobb gátlást (10-

45,2%). Ha szennyvizet néznénk, ez jó eredmény lenne, de a mezőgazdaságban a gazdálkodók arra törekednek, hogy az öntözővízként is használt hígtrágya termésnövekedést okozzon, anélkül, hogy negatívan hatna a növényekre, sőt a hígtrágya tápanyagtartalma elméletileg serkenti is a növények növekedését.

A cirok kivételével egyik növény sem mutatott serkentő hatást (22-23 ábra). A szeparált hígtrágyával kezelt hajdina, tritikálé, kerti zsázsa és fehér mustármagok gyökérhossza nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollemezeken lévő magvaktól.



21. Ábra: Az algasejt- növekedési %-a szeparált és nem szeparált hígtrágya különböző hígításaiban



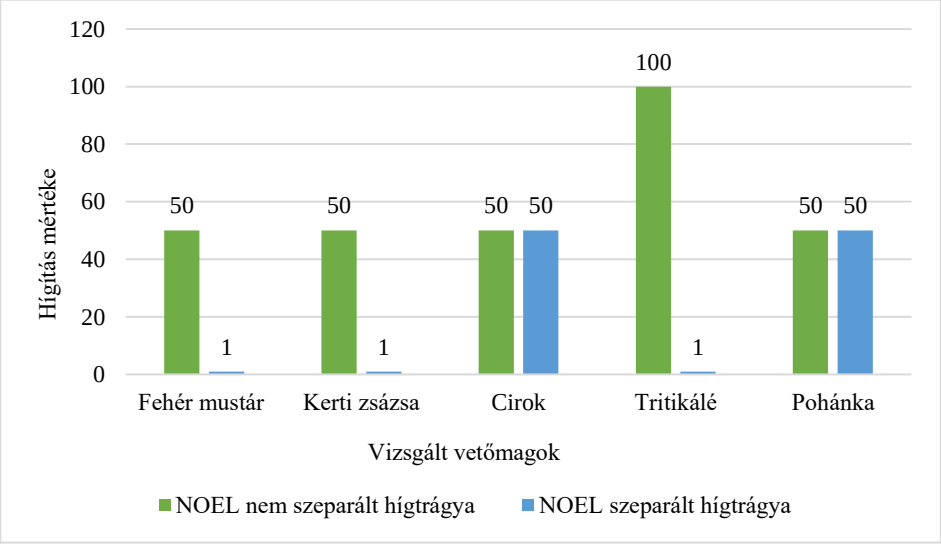
22. Ábra: Különböző magvak relatív csírázási aránya (%) hígítatlan szeparált és nem szeparált hígtrágyában

A hígítási sorokhoz meghatároztuk a NOEL-t, melyet a 23. ábrán szemléltetünk. Az érzékenynek tartott fehér mustárhoz képest mind a kerti zászsa, mind a hajdina és mind a tritikálé érzékenyebbnek bizonyult szinte valamennyi hígítás esetében. A cirok csíranövény a hígtrágya valamennyi hígítása esetében serkentéssel reagált.

Az alganövekedés-gátló teszt és a fitotoxicitási tesztek eredményei kihangsúlyozzák a hígtrágya szeparálásának a fontosságát és hatékonyságát. E technológia segítségével a mezőgazdaság termelékenyebb lehet, viszont tápanyag-gazdálkodás szempontjából fontos, hogy a szántóföldi kijuttatásra szánt hígtrágya mennyiségét optimális szinten határozzuk meg. A hígtrágya a tápanyag- és szervesanyag tartalma miatt előnyös a növénytermesztésben, de a túlzott használata ugyanazon a területen veszélyt jelenthet a talajvíz nitrát és foszforszennyezése miatt (Benke *et al.*, 2008). Sterritt és Lester (1980)

szerint a szennyvíziszap mezőgazdasági felhasználása nehézfémtartalma miatt jelenthet problémát.

Pan és munkatársai (2016) tanulmányából tudjuk, hogy ha a talaj nitrogéntartalma (ammónium, nitrit, nitrát) túl magas, az gátolhatja a növények csírázását. Norouzi *et al.*, (2016) kísérletében a dohány *(Nicotiana tabacum L.)*, a lucerna *(Medicago sativa L.)* és a cirok *(Sorghum bicolor L.)* jól reagált a nagyobb dózisú nitrogénkezelésre (150-300 kg/ha). Az általunk vizsgált hígtrágya a fent leírtak szerint nem tartalmazott mérgező ammóniumot (ammónium-nitrogén: 0,25 g/l), és a vizsgált telep nem érintkezett nehézfémforrásokkal. Ezért toxikológiai eredményeinket a hígtrágyában lévő egyéb káros anyagok hatásának tulajdonítjuk, mint például a gazdaságban használt gyógyszerek, tisztítószerek és természetes hormonhatású anyagok.



23. Ábra: NOEL, a hígtrágya azon legmagasabb hígítása, amely még nem fejt ki észrevehető toxikus hatást a vizsgált magvakra.

5. Általános következtetések, javaslatok

- Az intenzív tejtermelés ösztrogén-lábnyomának kimutatásához többféle vizsgálati módszert alkalmaztunk. Legfőbb vizsgálati módszerünk a YES-teszt volt, mely holisztikus eredményt ad.
- Abból a tényből, hogy a gyógyszerek hatóanyagaiból egyiket sem tudtuk a hígtrágyamintákból kimutatni, az a következtetés vonható le, hogy az állatban valamennyi metabolizálódik.
- A YES-teszt segítségével mért eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy érdemes egy valós és egy látszólagos hormonhatással kalkulálni. Amíg az Alfaglandin mindvégig, akár nagy hígításban is megtartja magas, valódi ösztrogénhatását, addig pl. a Gonavet hormonhatása csak látszólagosan magas, köszönhetően a szinerg segédanyagnak (klórkrezol). Az Ovarelin és Dinolytic EEQ értéke, melyek más segédanyagot tartalmaznak (benzil-alkohol) eleve alacsony és hamar a kimutatási határ alá kerül.
- Mivel az EDC vegyületek, vizsgálataink szerint lényegesen jobban kötődnek a hígtrágya szilárd, mint a folyékony fázisához, nagyüzemi léptékben szeparátorral viszonylag ártalmatlan „öntözővizet” és egy tápanyagokra és EDC vegyületekre nézve koncentrált komposzt-alapanyagot kapunk.
- Mind istállótrágya, mind hígtrágya kijuttatásának hatására megnő a talajok EEQ értéke. Az ott termesztett takarmánynövény gyökerében és hajtásában is az EDC vegyületek akkumulációja figyelhető meg. Ennek üteme a tavaszi N-fejtrágyázás hatására szignifikánsan megnő. Az olaszperje a kezelésekre dinamikusabban reagált, mint a silókukorica.

- A vizsgált növények EEQ értéke betakarításkor volt a legmagasabb. Ezt a magas EEQ értéket a tejsavas erjesztés körülményei (savas közeg, anaerob környezet, tejsavbaktériumok jelenléte) még 200 napos tárolás után sem csökkentették.
- A termelési ciklust a takarmány előállítása zárja. A betárolt tömegtakarmány a magas EDC tartalmával együtt kerül az állat elé a következő termelési ciklusban.
- Későbbi vizsgálatok kell, hogy kiderítsék, hogy az EDC vegyületek a nagyüzemileg termelt tejben, esetleg húsban megjelennek-e.

Kutatásunk alapján a javaslataink a következők:

- Tisztázni szükséges az ösztrogének biztonságos küszöbértékét a szárazföldi, vízi és emberi környezetben.
- Több és átfogó vizsgálatot kell készíteni az ösztrogének káros humán- és környezetegészségügyi hatásairól.
- Olyan szennyvíz- és trágyakezelési módszereket kell kidolgozni, melyekkel csökkenteni tudjuk a szervestrágyák ösztrogéntartalmát.
- További kutatásokat kellene végezni a talajban visszamaradt gyökerek (kukorica, olaszperje) sorsáról, hogy mi történik a gyökerekben elraktározott ösztrogénekkel. Vagyis hogyan érvényesül a talaj puffer- és tartamhatása, milyen kezelési eljárások tudják csökkenteni az EDC szintet (pl. a talaj átszellőztetése, a szántás szükségessége és mélysége, adalékanyagok használata, a talajba dolgozott biomassza mennyisége és minősége és a nitrogénellátottság szerepe.

- Javasoljuk a szeparátor használatát a következő okokból: a szeparált hígtrágya (folyékony frakció), bár tápanyagtartalma alacsonyabb, EDC tartalma annyira mérsékelt, hogy nagyobb mennyiségben kijuttatható a szántóföldekre. A szilárd frakció viszonylag koncentráltan fogja tartalmazni mind a tápanyagokat, mind az EDC vegyületeket, azonban mennyisége limitált, így könnyebben kezelhető, aerob módon komposztálható, majd a megfelelő kezelések után biztonságosan kijuttatható vagy komposztként értékesíthető.

6. Összefoglalás

A világon nagy mennyiségben állítanak elő olyan kémiai anyagokat, melyek kikerülve a természetbe befolyásolhatják az élőlények hormonális működését. A környezetünkben megjelenő ösztrogénhatású vegyületek számos forrásból származhatnak. Az egyik legnagyobb szennyezőforrást az intenzív állattartási technológiák jelentik. Irodalmi adatok alapján a hígtrágyával történő öntözés és intenzív állattartásból származó trágya termőföldre juttatása következtében a szteroid ösztrogének, beleértve az ösztron E1, ösztradiol 17β-E2, ösztriol E3, valamint a szintetikus ösztrogén 17α-EE2, mindenütt jelen vannak a termőtalajban. A növények felhalmozhatják az ösztrogéneket gyökereikben és hajtásaikban, melyek aztán bekerülve a táplálékláncba akár negatív hatást fejthetnek ki az emberi egészségre.

Kutatásunkban egy Pest megyei szarvasmarhatelepen használt 5 különböző ivarzásindukáló gyógyszer (Alfaglandin, PGF, Dinolytic, Gonavet, Ovarelin) és ezen belül 3 hatóanyag (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) sorsát követtük nyomon a felhasználástól egészen a hígtrágyában való megjelenéséig, 2017-től 2020-ig. A nemzetközi irodalmat is áttekintve azt találtuk, hogy az intenzív tejelő szarvasmarhatartásban felhasznált ivarzásindukáló hormonkészítmények mennyiségét és a hígtrágyában való megjelenését még nem vizsgálták. A tanulmány során áttekintettük a gyógyszerfogyasztást, valamint minden évben negyedéves ciklusokban, évszakonként vizsgáltuk meg a telepen keletkezett hígtrágya hormonhatását. Külön teszteltük a telepen alkalmazott hormonkészítmények hormonhatását is.

Az ösztrogénhatás vizsgálatokhoz a humán ösztrogénreceptort tartalmazó élesztőtesztet alkalmaztuk az ISO 19040 szabvány alapján. A YES (Yeast Estrogen Screen) teszt bizonyult a doktori munka fő vizsgálati módszerének, melyhez sok esetben analitikai mérés (UHPLC-FLD) is csatlakozott. Emellett a minták egy részével kiegészítő toxikológiai vizsgálatokat végeztünk: transzgénikus zebradánió (*Brachydanio rerio* Tg(vtg mCherry) fluoreszcenciateszt vitellogenin kimutatására, *Daphnia magna* 48-órás akut immobilizációs teszt, alga növekedésgátlási teszt (*Pseudokirchneriella subcapitata*), talajbaktérium-teszt *Azotobacter agile, Pseudomonas fluorescens* és vetőmag-csíráztatási teszt (ISO 18763) fitotoxicitás vizsgálatára öt növényfaj (cirok, tritikálé, fehér mustár, kerti zászsa, hajdina) esetében.

Kisparcellás kísérletekben vizsgáltuk a két szántóföldi növény (olaszperje, silókukorica) ösztrogénanyag-akkumulációját (E1, 17β-E2, 17α-E2, 17α-EE2, E3) istállótrágyával, illetve hígtrágyával kezelt területen, a fejlődésük több fenofázisában. Mintavétel történt a talajból, a növények gyökeréből, hajtásából, majd betakarításkor és több alkalommal az erjesztés későbbi szakaszaiban is.

Az eredmények statisztikai értékelésével (Pearson-féle korreláció és főkomponens-elemzés) az ivarzásindukálók felhasználása, a telep szaporodásbiológiája és a hígtrágya ösztrogénhatása közötti összefüggéseket tártunk fel.

Megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált gyógyszer-hatóanyag erős korrelációt mutatott a hígtrágya ösztrogénhatásával. A szántóföldi kísérletben igazoltuk, hogy a növények képesek az ösztrogénhatású anyagok akkumulációjára, többnyire a szakirodalomban ismert

gyökér>hajtás(=szár+levél)>generatív termés sorrendben, mely esetben feltételezzük egy szűrőmechanizmus létezését a gyökér és a hajtás határán, mert több esetben igen jelentős gyökérbeli felhalmozódás is csak kis részben volt kimutatható a hajtásban. Néha azonban, és ebben a N-fejtrágyázás utáni minták domináltak, buja növekedés indul be, melynek során az ösztrogénanyagok mennyisége mind abszolút, mind relatív (szárazanyagra vetített) értelemben jelentősen megnő. A felhalmozódás a főkomponens-analízis által is igazoltan a későbbi fenofázisokban is tart, és üteme csak kissé csökken.

A legmagasabb értékeket éppen a betakarításkor vett mintákból kaptuk; 17ß-E2-t és E3-at szinte valamennyi kezelés talaj- és hajtásmintájából ki tudtunk mutatni (ezek a tendenciák leginkább az olaszperje esetében voltak megfigyelhetők). A frissen betakarított és a már hónapok óta erjedő silókukorica és olaszperje-fűszenázs EEQ-értéke között minimális volt a különbség, tehát a tejsavas erjedés az ösztrogénanyagok mennyiségére nem volt hatással. Felezési időről tehát még 230 napos tárolás után sem beszélhetünk. Szalmás istállótrágya és hígtrágya összehasonlításában a kezelt növények EEQ-értéke nő, a hígtrágyával kezelteké lényegesen gyorsabban és nagyobb mértékben. Úgy tűnik, a magasabb szárazanyagtartalom, és itt különösen a szalmát és annak széntartalmát kell kiemelni, nagyobb pufferkapacitással jár a hígtrágyához képest és növeli a rendszer nitrogénlimitáltságát.

A toxikológiai csíratesztek többségében a hígtrágya még többszörös hígítás után is gátlást okozott, kivéve cirok esetében, ahol jelentős, akár 30%-os (hígítatlan, szeparált hígtrágya esetén 60%-os) serkentést tapasztaltunk. Ez azt mutatja, hogy a frissen, nagy

mennyiségben hígtrágyázott területeken első kultúraként érdemes szemescirokkal próbálkozni.

A jelenleg alkalmazott technológiákba a szeparátor használata viszonylag könnyen beilleszthető, mely nagymértékben csökkenteni tudja a hígtrágya hormonhatását. Megelőzésként a hormonhatás akár a megfelelő gyógyszerválasztással is csökkenthető.

Vizsgálataink alátámasztják, hogy a hígtrágya egy olyan anyag, melyet a szántóföldre történő kijuttatás előtt számos egyéb ok mellett a hormon- és gyógyszertartalma miatt is új kezelési módszerekkel kell ártalmatlanítani. Ez nemcsak környezetvédelmi szempontból, hanem a humánegészségügyi kockázatok miatt is fontos.

7. Új tudományos eredmények

1. Többféle, egymástól különböző vizsgálati módszerrel igazoltuk az EDC vegyületek **átvitelét** és **megjelenését** a **hígtrágyában**, a **kezelt talajban**, az azon termesztett **kultúrnövény gyökerében**, **hajtásában**, **termésében és az erjesztett tömegtakarmányban**. A jelen tudományos megközelítés Magyarországon és nemzetközi szinten is új kutatásnak számít.
2. Nemzetközi szabvány (ISO 19040-1:2018) alapján kidolgoztuk a YES (Yeast Estrogen Screen)-tesztet **génmódosított élesztőgombával** (*Sacharomices cerevisiae* BJ3505). **Műszeres analitikai módszerrel** (UHPLC-FLD) is megvizsgáltuk az összes minta ösztrogén (E1, 17α-E2, 17β-E2, 17α-EE2, E3) tartalmát. **Transzgénikus zebradánió teszt** Tg(vtg1:mCherry) segítségével szintén igazoltuk az EDC vegyületek megjelenését 4 különböző szarvasmarhatelep mindegyikének trágyamintájában.
3. A **tavaszi nitrogén-fejtrágyázás** jelentősen megnöveli a hajtás (levél és szár) ösztrogéntartalmát, nemcsak abszolút értékben, de tömegarányosan is. Megállapítottuk, hogy **az orvostudományban ismert „vér-agy gát" -hoz** hasonló mechanizmus lehet a növényi gyökér és hajtás határán, mert a gyökér kimagaslóan magas EDC-értékének is csak töredéke jelenik meg a hajtásban. Azonban a méréseink alapján a hajtásban még így is olyan mennyiség van jelen, amely humán- és környezetegészségügyi szempontból aggodalomra adhat okot.

4. Igazoltuk, hogy bizonyos esetekben **a növényi hajtásban a 17β-E2 igen erőteljesen fel tud halmozódni**, ellentétben a vonatkozó szakirodalom állításával. A felhalmozódás hígtrágyás kezelés esetén szignifikánsabb, mint istállótrágya esetében.
5. A **mésztartalom, akár a talajban, akár a kijuttatott műtrágyában, szintén pufferolja (ellaposítja) a hormontartalom növekedését**. Számszerűsítettük a hektáronként betakarított EDC vegyületek mennyiségét. Igazoltuk, hogy az erjesztés sem rövid, sem középtávon (200 nap) nem csökkenti érdemben a silózott takarmány hormontartalmát, „felezési időről" tehát nem beszélhetünk.
6. Igazoltuk, hogy **az ösztrogénhatású vegyületek jobban kötődnek a szilárd szemcsékhez**, mint a folyadékfázishoz. Annak ellenére, hogy a szeparálatlan hígtrágya vagy az üledékfázis csírázásgátló hatású, a felülúszó frakció több esetben inkább serkentést mutatott. A csíratesztekben az 5 növényfaj közül a **szemescirok** bizonyult a legellenállóbbnak.

8. Mellékletek

1. számú melléklet: A vizsgálataink során használt laboratóriumi eszközök:

1. Inkubátor rázógép, hőmérséklet, 30 ° C ± 1 ° C és 37 ° C ± 1 ° C. Típusa: Pol-Eko Aparatura SP.J.

2. pH-mérő, típusa: Adwa AD 11

3. Száraz sterilizáló, típusa: Binder

4. Centrifuga, típusa: Heraus Megafuge 40R

5. Rázógép, típusa: Assistent

6. Fagyasztó, legalább ≤ -18 ° C és ≤ -70 ° C. Típusa: Zanussi Lehel

7. Steril szűrő, cellulóz-acetát, 0,2 µm pórusméret.

8. Többcsatornás pipetták (öt és nyolc csatornás), típusa: Biohit

9. Egycsatornás pipetták, 5 µl-50 µl, 50 µl-100 µl, 100 µl-1000 µl, 1ml-5 ml. Típusa: Biohit

10. Átlátszó steril, polisztirol 96 lyukú lemezek lapos aljjal és fedéllel, típusa: Iwaki Elisa Plate

11. ELISA olvasó Mikroplate fotométer 96-lyukú lemezekre, az abszorbancia méréshez 580 nm-en vagy 620 nm-en.

12. Petri-csészék

13. Steril, 15 ml és 50 ml Falcon centrifugacső

14. Főzőpoharak

2. számú melléklet: A vizsgálataink során felhasznált reagensek és táptalajok:

1. Élesztő nitrogén bázis aminosavak nélkül

2. vízmentes α-D-glükóz, $C_6H_{12}O_6$, molekulatömeg 180,15 g / mol

3. L-Hisztidin-HCI, $C_6H_9N_3O_2 \times HCl \times H_2O$, molekulatömege 209,6 g / mol

4. L-Lizin-HCI, $C_6H_{14}N_2O_2 \times HCI$, molekulatömeg 182,65 g / mol

5. Réz (II) -szulfát-pentahidrát, $CuS0_4 \times 5H_20$, molekulatömege 249,69 g / mol

6. Ampicillin-nátrium só, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, molekulatömege 371,39 g / mol

7. Streptomicin-szulfát só, $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ $1{,}5H_2S0_4$, molekulatömege 728,69 g / mol

8. Mikrobiológiai agar, $(C_{12}H_{18}O_9)$ n

9. Sósavoldat, 1 M (HCI), molekulatömeg 36,46 g / mol

10. Nátrium-hidroxid, NaOH, molekulatömeg 40,00 g / mol

11. Etanol, ≥99,8%, CH_3CH_20H, molekulatömeg 46,07 g / mol

12. glicerin molekuláris biológiai vizsgálatokhoz, ≥99%, $HOCH_2CH$ (OH) CH_20H, molekulatömeg 92,09 g / mol

13. 17β-ösztradiol (E2), ≥98%, $C_{18}H_{24}O_2$, molekulatömege 272,38 g / mol

14. Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, $Na_2HP0_4 \times 2H_20$, molekulatömeg 177,99 g / mol

15. Nátrium-dihidrogén-foszfát-monohidrát, $NaH_2P0_4 \times H_20$, molekulatömeg 137,99 g / mol

16. Kálium-klorid, KCl, molekulatömeg 74,55 g / mol

17. Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgS0_4 \times 7H_20$, molekulatömege 246,47 g / mol

18. Klórfenolvörös-β-D-galaktopiranozid (CPRG), $C_{25}H_{22}C1_2O_{10}S$, molekulatömege 585,41 g / mol

19. Lyticase *Arthrobacter luteus* liofilizált porból, ≥2000 egység / mg fehérje

20. DL-Dithiothreitol, $HSCH_2CH$ (OH) CH (OH) CH_2SH, molekulatömeg 154,25 g / mol

21. Nátrium-dodecil-szulfát, CH_3 $(CH_2)_{11}OS0_3Na$, molekulatömege 288,38 g / mol

22. Aceton (*puriss p.a.*), CH_3COCH_3, molekulatömege 58,08 g / mol

23. MQ (millipore) víz, 1. fokozat, az ISO 3696 szabvány szerint; Legfeljebb 5 µS/cm vezetőképességű víz elfogadható.

3. számú melléklet: A gombatenyésztéshez felhasznált táptalajok:

Növekedési médium (Growth medium) – Mc Donnel

A tápoldatot steril körülmények között készítjük el. 2 ° C és 8 ° C közötti hőmérsékleten az oldat legfeljebb egy hétig használható fel. -18 ° C-on tárolva a tápoldat legfeljebb hat hónapig használható fel, mely tartalmaz: 80 ml steril vízet, 10 ml 10x SD- tápközeget és 10 ml 10x MCD-DO-tápközeget.

Teszthez használt gomba tápoldat (Exposure medium)

Összekeverünk: 4,2 ml 10x SD- tápközeget + 4,2 ml 10x DO-tápközeget +1,6 ml glükózt + 99 µl $CuSO_4$ oldatot + 67 µl Ampicillin törzsoldatot + 67 µl Streptomycin törzsoldatot.

A reakcióelegyet közvetlenül használat előtt készítjük el. A 96 lyukú lemezre 5 ml térfogat szükséges.

LacZ puffer

950 ml vízben feloldunk 10,67 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 0,75 g KCl + 0,25 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$.

7,0 ± 0,2 értékre beállítjuk a pH-t, pH beállítás előtt zavaros lehet az oldatunk.

5,5 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ és 1 g $NaC_{12}H_{25}SO_4$ nátrium-dodecil-szulfátot feloldunk az oldatban.

A végső térfogatot 1000 ml-re állítottuk be vízzel. Az oldat szobahőmérsékleten legfeljebb 6 hónapig használható.

LacZ reakcióelegy

1 ml lacZ pufferben feloldunk 0,4 mg CPRG (klórfenolred-β-D-galaktopiranozid) + 0,154 mg DTT (DL-Dithiothreitol) + 0,125 mg Lyticase.

Használat előtt készítjük, 6 ml szükséges 1 db lemezre.

10x SD Medium

Feloldunk 67 g aminosavak nélküli élesztő nitrogénbázist és 200 g glükózt 1 liter vízben. Sterilizáljuk az oldatot szűréssel (cellulóz-acetát, 0,2 µm). Nem autoklávozzuk az oldatot, mert hőre bomló vitaminokat tartalmaz,

mint például a biotin. Az oldatot 50 ml-es aliquotokban tároljuk -18 °C-on. Az oldat legfeljebb 12 hónapig használható fel.

10x DO (McDonnell)

175 mg L-lizin-HCl és 120 mg L-hisztidin-HCl feloldunk 500 ml vízben. Szűréssel sterilizáljuk (cellulóz-acetát, 0,2 µm) és az oldatot 6 ml-es aliquotokban ≤ -18 ° C-on tároljuk, legfeljebb hat hónapig használható fel.

$CuSO_4$ oldat

250 mg $CuSO_4 \times 5\ H_2O$-t 100 ml vízben feloldjuk, majd autoklávozzuk. Az oldat szobahőmérsékleten 12 hónapig használható.

Ampicillin törzsoldat

1 g Ampicillin-nátrium sót 10 ml vízben feloldunk. Sterilizáljuk az oldatot szűréssel (cellulóz-acetát, 0,2 µm), és -18 °C-on tároljuk. A készletek legfeljebb 12 hónapig használhatók.

Streptomicin törzsoldat

1 g Streptomicin-szulfát sót 10 ml vízben oldunk. Sterilizáljuk az oldatot szűréssel (cellulóz-acetát, 0,2 µm), és -18 °C-on tároljuk. A készletek legfeljebb 12 hónapig használhatók fel.

3. számú mellékelt: Hígtrágyaminták analitikai eredményei (a vizsgált gyógyszerhatóanyagok: D-Phe6-gonadorelin, Kloprosztenol, Dinoproszt-trometamin és kísérőanyagok: klórkrezol, benzil-alkohol mind kimutatási határ alatt voltak, F-folyékony minta, I-iszap minta, a számok az egyes negyedéveket jelölik)

Hígtrágyaminták analitikai eredményei					
Minta jele	**YES (EEQ)**	**E1 (µg/l)**	**E3 (µg/l)**	**17α-E2 (µg/l)**	**17β-E2 (µg/l)**
2017_F_1/1	139,2	<LOD	20,784	<LOD	<LOD
2017_F_1/2	61,7	<LOD	12,932	<LOD	<LOD
2017_F_1/3	19,3	<LOD	6,41	<LOD	<LOD
2017_F_1/4	19,6	<LOD	10,544	<LOD	<LOD
2017_I_1/1	1337	<LOD	11,812	1,876	<LOD
2017_I_1/2	2555,5	<LOD	14,86	2,4	<LOD
2017_I_1/3	1415	<LOD	8,138	2,05	<LOD
2017_I_1/4	142	<LOD	25,696	<LOD	<LOD
2018_F_1/1	124	<LOD	17,28	<LOD	<LOD
2018_F_1/2	89	<LOD	12,3	<LOD	<LOD
2018_F_1/3	226	<LOD	20,546	1,94	0,65
2018_F_1/4	214	<LOD	7,806	2,006	0,4
2018_I_1/1	1355	<LOD	6,574	2,098	<LOD
2018_I_1/2	1900	<LOD	3,914	1,45	6,668
2018_I_1/3	4570	<LOD	8,606	2,274	6,206
2018_I_1/4	3970	<LOD	25,82	2,202	7,25
2019_F_1/1	137,2	<LOD	27,956	2,45	0,8
2019_F_1/2	156,5	<LOD	11,77	2,012	0,9
2019_F_1/3	193	<LOD	10,446	2,254	1,2
2019_F_1/4	271	<LOD	30,732	2,024	1,7
2019_I_1/1	2745	<LOD	21,19	2,8	6,268
2019_I_1/2	1990	<LOD	12,254	2,04	6,338
2019_I_1/3	3200	<LOD	6,364	1,8	7,08
2019_I_1/4	4990	<LOD	13,1	2,45	10,15
2020_F_1/1	248	<LOD	8,288	2,022	1,1
2020_F_1/2	196,5	<LOD	10,392	1,924	0,9
2020_F_1/3	288	<LOD	11,276	2,002	1,2
2020_F_1/4	373	<LOD	26,266	1,984	1,5
2020_I_1/1	2730	<LOD	17,466	3,1	6,91
2020_I_1/2	3490	<LOD	15,028	3,4	7,008
2020_I_1/3	6300	<LOD	28,6	3,9	10,9
2020_I_1/4	5325	<LOD	32,084	2,91	10,8

4. számú melléklet: Az olaszperje-talaj mintáinak analitikai eredményei (K1, K2 – kontroll terület, T8, T3 – istállótrágyával kezelt terület, V5, V4, V3, V2 – hígtrágyával kezelt terület)

OLASZPERJE – TALAJ (µg/kg)						
		E1	17α-E2	17β-E2	17α-EE2	E3
K1	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K2	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T8	1.mintavétel	<LOD	0,3	1,4	<LOD	2,8
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,2	<LOD	2,1
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	0,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	0,7
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	0,7
T3	1.mintavétel	<LOD	0,8	1,8	<LOD	4,8
	2.mintavétel	<LOD	0,6	1,7	<LOD	4,7
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	1,2	<LOD	4,4
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	1,5	<LOD	4,8
	5.mintavétel	<LOD	0,9	1,6	<LOD	4,9
V5	1.mintavétel	<LOD	0,4	1,4	<LOD	3,9
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	2,8
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,4
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,9
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	1,9
V4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	2,8
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,2
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,4
	4.mintavétel	<LOD	2,4	<LOD	<LOD	0,8
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,1	<LOD	1,2

V3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	3,1
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	2
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,3	<LOD	2,4
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,8
V2	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	2,6
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,3
	3.mintavétel	<LOD	1,2	<LOD	<LOD	1,4
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	1,6
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	1,8

5. számú melléklet: Az olaszperje-gyökér mintáinak analitikai eredményei

OLASZPERJE – GYÖKÉR (µg/kg)						
		E1	17α-E2	17β-E2	17α-EE2	E3
K1	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K2	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T8	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	0,8
T3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	0,6
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	1,3
V5	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,9
V4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,3	<LOD	0,9
V3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,3	<LOD	1,8
V2	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	1,4

6. számú melléklet: Az olaszperje-hajtás mintáinak analitikai eredménye

OLASZPERJE – HAJTÁS (µg/kg)						
		E1	17α-E2	17β-E2	17α-EE2	E3
K1	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K2	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T8	1.mintavétel	<LOD	<LOD	1,7	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,7	<LOD	0,4
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,4	<LOD	0,9
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,2	<LOD	2,4
T3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	1,7	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,7	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,5	<LOD	0,9
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,8	<LOD	2,8
V5	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	0,2
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,2	<LOD	1,8
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,5	<LOD	2,8
V4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	0,4
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,2	<LOD	2,3
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,5	<LOD	3,4
V3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,1	<LOD	1,8
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,6	<LOD	3,9
V2	1.mintavétel	<LOD	<LOD	1,2	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,2	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,6	<LOD	2,4
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,9	<LOD	4,2

7. számú melléklet: A kukorica-talaj mintáinak analitikai eredményei (K3, K4 – kontroll területek, T4, T5 – istállótrágyával kezelt területek, V6, V7, V8, V9 – hígtrágyával kezelt területek)

KUKORICA – TALAJ (µg/kg)						
		E1	17α-E2	17β-E2	17α-EE2	E3
K3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T4	1.mintavétel	<LOD	0,6	0,9	<LOD	3,6
	2.mintavétel	<LOD	0,1	0,9	<LOD	2,8
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	2,2
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	2,4
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	1,9
T5	1.mintavétel	<LOD	0,9	1,4	<LOD	4,6
	2.mintavétel	<LOD	0,4	1,2	<LOD	4
	3.mintavétel	<LOD	0,1	0,7	<LOD	4,1
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	3,8
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	2,9
V6	1.mintavétel	<LOD	0,2	1,1	<LOD	3,5
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	3,1
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	3,2
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	2,7
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	1,9

V7	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	1,8
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	1,2
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,5
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,2
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
V8	1.mintavétel	<LOD	0,3	1,5	<LOD	3,5
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	2,9
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	2,1
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	1,1
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	1,1
V9	1.mintavétel	<LOD	0,4	1,2	<LOD	2,9
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,2	<LOD	2,7
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	1,9
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	1,7
	5.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,8

8. számú melléklet: A kukorica-gyökér mintáinak analitikai eredményei

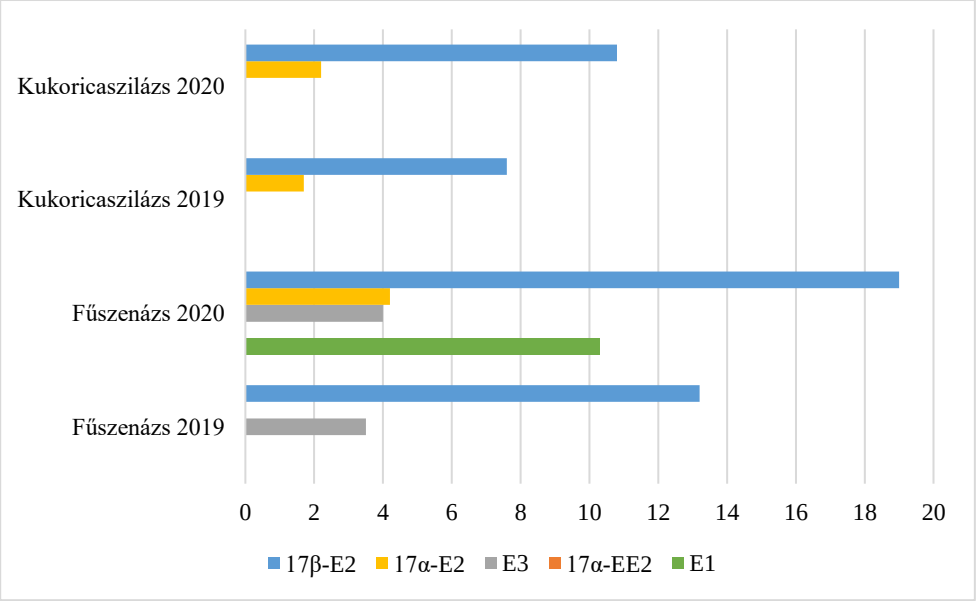
KUKORICA – GYÖKÉR (µg/kg)						
		E1	17α-E2	17β-E2	17α-EE2	E3
K3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	2,8
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,7	<LOD	2,9
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,9	<LOD	2,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,8	<LOD	3,2
T5	1.mintavétel	<LOD	<LOD	1,3	<LOD	2,9
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	1,9	<LOD	3
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	3	<LOD	4,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	4,2	<LOD	5,6
V6	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,9
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	1,7
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	2,1
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,5	<LOD	4,2
V7	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	2,1
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	2,5
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	1,9	<LOD	3,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	2,9	<LOD	3,8
V8	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	2,7
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	2,8
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	2,9	<LOD	3,6
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	3,3	<LOD	4,4
V9	1.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	2,6
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,3	<LOD	2,5
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	1,5	<LOD	3,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	2,2	<LOD	3,9

9. számú melléklet: A kukorica hajtás, szemtermés minták analitikai eredményei

KUKORICA - HAJTÁS, SZEMTERMÉS (µg/kg)						
		E1	17α-E2	17β-E2	17α-EE2	E3
K3	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T4	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,7
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,8
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,1	<LOD	<LOD
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T5	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,6
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	0,7
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	1,2
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,4
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,3
V6	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,2
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
V7	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,4
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	0,9
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,8	<LOD	0,9
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,1

V8	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,2
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	0,2
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	0,7
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	0,7
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,3
V9	1.mintavétel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,6
	2.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,6
	3.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	1,1
	4.mintavétel	<LOD	<LOD	0,2	<LOD	0,8
	szemtermés	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,2

10. számú melléklet: Fűszenázs és kukoricaszilázs minták analitikai eredményei



9. Irodalomjegyzék

1. ACIR, I.H., & GUENTHER, K., (2018): Endocrine disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. Science of The Total Environment, 635, 1530 1546. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.079.
2. ADEEL, M., SONG, X., WANG, Y., FRANCIS, D., YANG, Y., (2017): Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, Environment International, 99: 107-119.
3. ADEEL, M., YANG, Y.S., WANG, Y.Y., SONG, X.M., AHMAD, M.A., ROGERS, H.J., (2018): Uptake and transformation of steroid estrogens as emerging contaminants influence plant development. Environ. Pollut. 243:1487–149.
4. ADLERCREUTZ, H., FOTSIS, T., BANNWART, C., HAMALAINEN, E., BLOIGU, S., OLLUS, A., (1986): Urinary estrogen profile determination in young finnish vegetarian and omnivorous women, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 24, No. 1, 289-296.
5. ADLERCREUTZ, H., MAZUR, W., (1997): Phyto-oestrogens and Western Diseases, The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann Med 29,9.
6. AGUIAR, P.M., LIMA T.D.M., COLLEONI G.W.B., STORPIRTIS, S., (2017): Efficacy and safety of bortezomib, thalidomide, and lenalidomide in multiple myeloma: an overview of systematic reviews with meta-analyses. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 113: 195–212.

7. ALZIEU, C., SANJUAN, J., DELTREIL, J. P. & BOREL, M., (1986): Tin contamination in Aracachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. Mar. Poll. Bull., 17(11):494-7.
8. ARANDA, A., PASCUAL, A., (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression, Physiological Reviews, 81(3).
9. ARNAL, J.F., LENFANT, F., METIVIER, R., FLOURIOT, G., HENRION, D., ADLANMERINI, M., FONTAINE, C., GOURDY, P., CHAMBON, P., KATZENELLENBOGEN, B., KATZENELLENBOGEN, J. (2017): Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. Physiological Reviews, 97(3): 1045 1087. doi:10.1152/physrev.00024.2016.
10. BAKER, V.A., (2001): Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard, Toxicology in Vitro, 15:413-419.
11. BAKOS, K., KOVÁCS, R., STASZNY, T., SIPOS, D.K., URBÁNYI, B., MÜLLER, F., CSENKI, Z., KOVÁCS, B., (2013): Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (Danio rerio). Aquat. Toxicol. 136–137. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.004
12. BERGERON, R.M., THOMPSON, T.B., LEONARD, L.S., PLUTA, L., GAIDO, K.W., (1999): Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line, Molecular and Cellular Endocrinology, 150:179-187.
13. BOLONG, N., ISMAIL, A., SALIM, M.R., MATSUURA, T., (2009): A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. Desalination 239. 229–246.

14. BOVEE, T.F.H., HELSDINGEN, R.J.R., RIETJENS, I.M.C.M., KEIJER, J., HOOGENBOOM, R.L.A.P., (2004): Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptor alfa and beta, and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 91:99-109.

15. BOWLIN, K.M., (2014): Effects of β-estradiol on Germination and Growth in Zea mays L. M.Sc. thesis. Northwest Missouri State University, Maryville, Missouri, U.S.A.

16. BROWN, G.S. (2006): The Effects of Estrogen on the Growth and Tuberization of Potato Plants (Solanum tuberosum cv. 'Iwa') Grown in Liquid Tissue Culture Media. M.Sc. Thesis. University of Canterbury, New Zealand.

17. BRYAN, G.W., GIBBS, P. E., HUMMERSTONE, L.G., BURT, G. R. (1986): The Decline of the Gastropod Nucella Lapillus Around South-West England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 66(03), 611. doi:10.1017/s0025315400042247

18. BURKHARDT-HOLM, P., (2010): Endocrine Disruptor and Water Quality: A state of the art review. Water Resources Development, Vol. 26, No. 3, 477-493. DOI: 10.1080/07900627.2010.489298

19. CABATON, N., DUMONT, C., SEVERIN, I., PERDU, E., ZALKO, D., CHERKAOUI-MALKI, M., CHAGNON, M.CH., (2009): Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)

methane (bisphenol F) and its derivates in the HepG2 cell line, Toxicology, 255:15-24. https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.024

20. Canada Gazette, Part II: Final Order Adding Bisphenol A, a Substance in Batch 2 of the Challenge, to Schedule 1 to the Canadian Environmental Protection Act, 1999.

21. CANTON, J.H., and ADEMA, D.M.M., (1978): Reproducibility of short-term and reproduction toxicity experiments with Daphnia magna and comparison of the sensitivity of Daphnia magna with Daphnia pulex and Daphnia cucullata in short-term experiments, Hydrobiologia 59:135-140.

22. CAO, Y., CALAFAT, A.M., DOERGE, D.R., UMBACH, D.M., BERNBAUM, J.C., TWADDLE, N.C., YE, X., ROGAN, W.J., (2009): Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula, Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, 19:223-234.

23. CARD, M.L., SCHNOOR, J.L., CHIN, Y., (2013): Transformation of natural and synthetic estrogens by maize seedlings. Environ. Sci. Technol. 47, 5101–5108.

24. CARON, E., FARENHORST, A., ZVOMUYA, F., GAULTIER, J., RANK, N., GODDARD, T., SHEEDY, C., (2010): Sorption of four estrogens by surface soils from 41 cultivated fields in Alberta, Canada, Geoderma, 155:19-30.

25. CDER, CVM, (2018): Guidance for industry bioanalytical method validation U.S. Department of Health and Human Services food and drug administration center for drug evaluation and research (CDER) Center for Veterinary medicine (CVM).

26. CEC, (2000): Working Document on Sludge (3rd Draft), Commission of the European Communities Directorate-General Environment, ENV.E.3/LM, Brussels, 27 April 2000.

27. CERNA, T., Ezechias, M., SEMERÁD, J., GRASSEROVÁ, A., CAJTHAML, T., (2022): Evaluation of estrogenic and antiestrogenic activity in sludge and explanation of individual compound contributions, Journal of Hazardous Materials, 423: 127108.

28. CHAOUI, A., El FERJANI, E. (2013) β-estradiol protects embryo growth from heavy-metal toxicity in germinating lentil seeds. J. Plant Growth Reg. 32. 636–645.

29. CHEN, CH.Y., (2004): Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga – Bangia atropurpurea, Water Research, 38:1014-1018.

30. CHEN, H., HU, J., YANG, J., WANG, Y., XU, H., JIANG, Q., GONG, Y., GU, Y., SONG, H., (2010): Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens 96, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.015

31. CHEN, X., LI, Y., JIANG, L., HU, B., WANG, L., AN, S., ZHANG, X. (2020): *Uptake, accumulation, and translocation mechanisms of steroid estrogens in plants. Science of The Total Environment, 141979.* doi:10.1016/j.scitotenv.2020.1419

32. CHEN, Y.C.J., YU M.L.M., ROGAN, WJ, et al. A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-Cheng children. American Journal of Public Health 1994; 84: 415–421.

33. COFFEY, D.S. (2001): Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. Urology, 57.31-38.

34. COLDHAM, N. G., DAVE, M., SIVAPATHASUNDARAM, S., MCDONNELL, D. P., CONNOR, C., & SAUER, M. J., 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. Environmental Health Perspectives. 105. (7) 734–742
35. COLDHAM, N.G., DAVE, M., SIVAPATHASUNDARAM, S., MCDONNEL, D.P., CONNOR, C., SAUER, M.J., (1997): Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay, Environmental Health Perspective, 105:734-742.
36. COLLINS, C., FRYER, M., GROSSO, A., (2006): Plant uptake of non-ionic organic chemicals. Environmental Science Technology. 40:45–52.
37. COMBALBERT, S., HERNANDEZ-RAQUET, G., (2010): Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. Applied Microbiology and Biotechnology. 86:1671-1692.
38. COWIN, P.A., FOSTER, P.M.D., RISBRIDGER, G.P., (2007): Endocrine Disruption in the Male, The Basic Biology of Endocrine Disruption, 33-62.
39. CZAJKA, C. P. & LONDRY, K. L. (2006): Anaerobic biotransformation of estrogens, Science of the Total Environment, 367(2–3). pp. 932–941.
40. CSÁVÁS, I.- FEKETE, L. - KISS, O. - VERMES, L. (1975): A hígtrágya kezelési módszereinek vizsgálata szakosított sertéstelepeken. Akadémiai Kiadó, Budapest. 103.p.
41. CSENKI, Z., GARAI, E., RISA, A., CSERHÁTI, M., BAKOS, K., MÁRTON, D., BOKOR, Z., KRISZT, B., URBÁNYI, B., (2019): Biological evaluation of microbial toxin degradation by

microinjected zebrafish (Danio rerio) embryos. Chemosphere 227. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.014

42. CSENKI, Z., HORVÁTH, Á., BOCK, I., GARAI, E., KEREKES, F., VÁSÁRHELYI, E., KOVÁCS, B., URBÁNYI, B., MUELLER, F., BAKOS, K., (2020): Using tg(Vtg1:Mcherry) zebrafish embryos to test the estrogenic effects of endocrine disrupting compounds. J. Vis. Exp. 2020, 1–15. https://doi.org/10.3791/60462

43. CSENKI, Z., GUBÓ, E., GARAI, E., BAKOS, K., KÁNAINÉ-SIPOS, D., VÁSÁRHELYI, E., URBÁNYI, B., SZAKÁL, P., PLUTZER, J., (2022): Microinjection based zebrafish embryo test for the detection of estrogenic substances in slurry based irrigation water and its combinated application with yeast estrogen screen, Agricultural Water Management, 272.

44. CSTEE, Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. 2004. Subgroup meeting of Technical Committee on New and Existing Substances and Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) on the environmental risk assessments of cadmium and zinc. Ispra, Italy: Joint Research Committee. ECBTCNES0804(ERAR_CD&ZN_meeting25.08.2004).

45. DARGNAT, C., TEIL, M.J., CHEVREUIL, M., BLANCHARD, M., (2009): Phthalate removal throughout wastewater treatment plant case study of marne aval station (France), Science of the Total Environment, 407:1235-1244. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.027

46. DE FUR, P. L., (2004): Use and Role of Invertebrate Models in

Endocrine Disruptor Research and Testing. ILAR Journal, 45(4), 484–493. doi:10.1093/ilar.45.4.484

47. DE MES, T., ZEEMAN, G., LETTINGA, G., (2005): Occurrence and Fate of Estrone, 17β-estradiol and 17α-ethynylestradiol in STPs for Domestic Wastewater. Environmental Science and Biotechnology, 4, 275-311.

48. DIRANDEH, E., ROODBARI, A.R., COLAZO, M.G., (2015): Double-OvSynch, compared with presynch with or without GnRH, improves fertility in heat-stressed lactating dairy cows. Theriogenology. 83. (3) 438–443.

49. DIRECTIVE 2009/48 EC: Guidance document on the application of directive 2009/48/EC on the safety of toys.

50. DIRECTIVE 76/768/EEC relating to cosmetic products (OJ L 262, 27.9.1976, p. 169) (to be replaced as of 11 July 2013 by Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products, OJ L 342, 22.12.2009, p. 59)

51. DODDS, E.C., GOLDBERG, L., LAWSON, W., ROBINSON, R., (1938): Oestrogenic Activity of certain synthetic compounds, Nature, 141:247-248.

52. ENCARNACAO, T., PAIS, A. A., CAMPOS, M. G., BURROWS, H.D., (2019): Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment. Science Progress, 102(1):3–42. doi:10.1177/0036850419826802 10.1177/0036850419826802

53. ENCARNACAO, T., PAIS, A.A.C.C., CAMPOS, M.G., BURROWS, H., (2019): Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment, Science Progress, 102(1):3-42.

54. ERDAL, S., DUMLUPINAR, R., 2011. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. Acta Physiol. Plant. 33, 1011–1017.

55. FANG, H., TONG, W., PERKINS, R., SOTO, A.M., PRECHTL, N.V., SHEEHAN. D.M., (2000): Quantitative Comparisons of in Vitro Assays for Estrogenic Activities. Environmental Health Perspectives.108:8.

56. FENICHEL, P., and CHEVALIER, N., (2017): Environmental endocrine disrupters: new diabetogens? Comptes Rendus Biologies, 340: 446–452.

57. FOX, G.A., (1992): Epidemiological and pathobiological evidence of contaminant-induced alterations in sexual development in free-living wildlife, Advances in Modern Environmental Toxivology, 21. DART/TER/95003767.

58. FOX, J.E., (2004): Chemical Communication Threatened by Endocrine-Disrupting Chemicals, Environmental Health Perspective, 112:648-653.

59. FRANKS, C.G., (2006): Phytoremediation of Pharmaceuticals With Salix exigua. M.Sc. Thesis Lethbridge, Alta. University of Lethbridge, Faculty of Arts and Science, Canada.

60. FROMME, H., KÜCHLER, T., OTTO, T., PILZ, K., MÜLLER, J., WENZEL, A., (2002): Occurrence of phthalates and bisphenol-A and F in the environment, Water Research, 36:1429-1438.

61. FRY, D.M., (1995): Reproductive effects in bird exposed to pesticides and industrial chemicals, Environmental Health Perspectives, 103:165-171.

62. FRY, D.M., TOONE, C.K., (1981): DDT-induced feminization of gull embryos, Science, 213(4510), 922-924, doi:10.1126/science.7256288

63. FU, P., KAWAMURA, K., BARRIE, L.A., (2009): Photochemical and other sources of organic compounds in the Canadian high arctic aerosol pollution during winter-spring, Environmental Science Technology, 43:286-292.

64. FURUE, M., UENOTSUCHI, T., URABE, K., ISHIKAWA, T., KUWABARA, M., (2005): Overview of Yusho. Journal of Dermatological Science; 2005: S3–S10.

65. GÁBOR, G., TÓTH, F., SZÁSZ, F., PETRÓ, T., GYÖRKÖS, I., (2004): A két ellés közötti idő csökkentésének lehetőségei tejelő szarvasmarha-állományban. 2. Ivarzásindukciós és ovulációszinkronizálási eljárások. Magyar Állatorvosok Lapja. 126. 658–663

66. GAO, D., LI, Z., WEN, Z., REN, N., (2014): Occurrence and fate of phthalate esters in full-scale domestic wastewater treatment plants and their impact on receiving waters along the Songhua River in China, Chemosphere, 95:24-32. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.009

67. GORE, A.C., CREWS, D., DOAN, L.L., MERILL, M.L., PATISAUL, H., ZOTA, A., (2014): Introduction to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), A guide for public interest organizations and policy-makers. Endocrine Society, Hormone Science to Health.

68. GRUIZ, K., HORVÁTH, B., and Molnár, M., (2001): *Környezettoxikológia*. Műegyetemi Kiadó, Budapest.

69. GUAN, M., RODDICK, J.G. (1988): Comparison of the effects of epibrassinolide and steroidal estrogens on adventitious root growth and early shoot development in mung bean cuttings. Physiol. Plant. 73. 426–431.

70. GUBÓ, E., KISS-SZARVÁK, I., ERDENEBAATAR, M., GUBÓ, R., HORVÁTH, B., SZAKÁL, P., PLUTZER, J., (2021): Ecotoxicological investigations of milking cow slurry and changes of oestrogenic compounds in the solid and liquid phase, Energy, Ecology and Environment, DOI:10.1007/s40974-021-00234-1

71. GUDDA, F.O., ATEIA, M., WAIGI, M.G., WANG, J., GAO, Y., (2022): Ecological and human health risks of manure-borne steroid estrogens: A 20-year global synthesis study. Journal of Environmental Management. 301 113708. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113708

72. HAIYAN, R., SHULAN, J., ud din AHMED, N., DAO, W., CHENGWU, C. (2007): Degradation characteristics and metabolic pathway of 17α-ethynylestradiol by Sphingobacterium sp. JCR5. Chemosphere 66.340–346.

73. HAMID, H., ESKICIOGLU, C. (2012): Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: a review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. Water Res. 46.5813–5833.

74. HANSELMAN, T. A., GRAETZ, D. A. & WILKIE, A. C. (2003): Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review, Environmental Science & Technology, 37(24). 5471–5478.

75. HANSEN, P., DIZER, H., HOCK, B., MARX, A., SHERRY, J., McMASTER, M., BLAISE, C. (1998): Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. Trend Anal Chem, 17.448-451

76. HAO, Z., XIAO, Y., JIANG, L., BAI, W., HUANG, W., YUAN, L., (2018): Simultaneous determination of bisphenol a, bisphenol F, 4-nonylphenol, 4-n-nonylphenol, and octylphenol in grease-rich food by carb/PSA solid-phase extraction combined with highperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Anal. Methods 11 (2), 589–597.

77. HARRISON, P.T.C., HOLMES, P., HUMFREY, C.D.N., (1997): Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? The Science of the Total Environment, 205:97-106.

78. HEIMOVICS, S.A.; TRAINOR, B.; SOMA, K., (2015): Rapid Effects of Estradiol on Aggression in Birds and Mice: The Fast and the Furious, Integrative and Comparative Biology, 55, 281–293.

79. HENNIES, M., WIESMANN, M., ALLNER, B., & SAUERWEIN, H. (2003): Vitellogenin in carp (Cyprinus carpio) and perch (Perca fluviatilis): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. The Science of The Total Environment, 309(1-3), 93–103. doi:10.1016/s0048-9697(03)00005-6

80. HERBST, A.L., ULFELDER, H., POSKANZER, D.C., (1971): Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, The New England Journal of Medicine, 284(16):878-881.

81. HONG, L. T. A., (2012): The YES Assay as a Tool to Analyse Endocrine Disruptors in Different Matrices in Vietnam. Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) Lehr-und Forschungsbereich Pflanzenernährung der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn.

82. HUANG, R.P., LIU, Z.H., Yin, H., DANG, Z., WU, P.X., ZHU, N.W., LIN, Z., (2018): Bisphenol A concentrations in human urine, human intakes across six continents, and annual trends of average intakes in adult and child populations worldwide: a thorough literature review. Science of the Total Environt, 626: 971–981.

83. HUTCHINS, S.R., WHITE, M.V., HUDSON, F.M., FINE, D.D., (2007): Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. Environ Sci Technol. 41.738–744.

84. IMAI, S., SHIRAISHI, A., GAMO, K., WATANABE, I., OKUHATA, H., MIYASAKA, H., IKEDA, K., BAMBA, T., HIRATA, K. (2007): Removal of phenolic endocrine disruptors by Portulaca oleracea. J. Biosci. Bioeng. 103. 420–426.

85. ISO 19040-1:2018, (2018): Water Quality Determination of the Estrogenic Potential of Water and Waste Water Part 1: Yeast Estrogen Screen, Saccharomyces Cerevisiae.

86. ISO 6341 Water Quality, (2012): Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia Magna Straus, Cladocera, Crustacea, Acute Toxicity Test.

87. ISO 8692 Water Quality, (2012): Fresh Water Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae.

88. JANECZKO, A., FILEK, W., BIESAGA-KOSCIELNAK, J., MARCINSKA, I., JANECZKO, Z. (2003): The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in Arabidopsis thaliana: comparison with the effect of 24-epibrassinolide. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72.147–151.

89. JAROŠOVÁ, A., (2006): Phthalic acid esters (PAEs) in the food chain. Czech Journal of Food Science, 24:223-231.

90. JHA, A.N., HAGGER, J.A., HILL, S.J., (2000): Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, Mytilus edulis. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35:343-350.

91. JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C.R., BRIGHTY, G.C., SUMPTER, J.P., (1998): Widespread sexual disruption in wild fish, Environmental Science Technology,32(17):2498–2506.

92. JOBLING, S., SUMPTER, J.P., (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes, Aquatic Toxicology, 27:361-372.

93. JOHNSON, A.C., WILLIAMS, R.J, MATTHIESSEN, P. (2006): The potential steroid hormone contribution of farms animals to freshwaters the united kingdom as a case study. Sci Total Environ 362.166–178.

94. JONES, P.D., DE COEN, W.M., TREMBLAY, L., GIESY, J.P., (2000): Vitellogenin as biomarker for environmental estrogens, Water Science and Technology,42(7-8):1-14. doi:10.2166/wst.2000.0546

95. KAKALEY, EKM., BLACKWELL, BR., CARDON, M.C.,

CONLEY, J.M., EVANS, N., FEIFAREK, D.J., FURLONG, E.T., GLASSMEYER, S.T., GRAY, L.E., HARTIG, P.C., KOLPIN, D.W., MILLS, M.A., ROSENBLUM, L., VILLENEUVE, D.L., WILSON, V.S., (2020): De Facto Water Reuse: Bioassay suite approach delivers depht and breadth in endocrine active compound detection, Science of The Total Environment, 699:134297.

96. KALOCSAI, R., SHCMIDT, R., SZAKÁL, P., GICZI, ZS., POGÁNY, É., (2007): Az istállótrágyázás és helye a tápanyaggazdálkodásban, Agro Napló, 11:9-69-74.

97. KÁDÁR, I. (1995): A talaj–növény–állat–ember tápláléklánc szennyeződése kémiai elemekkel Magyarországon. KTM, MTA-TAKI. Akaprint. Budapest.

98. KELCE, W., STONE, CH.R., LAWS, S.C., GRAY, L.E., KEMPPAINEN, J.A., WILSON, E.M., (1995): Persistent DDT metabolite p, p- DDE is a potent androgen receptor antagonist, Nature, 375.

99. KERDIVEL, G., HABAUZIT, D., & PAKDEL, F., (2013): Assessment and Molecular Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals That Interfere with Estrogen Receptor Pathways. International Journal of Endocrinology, 2013, 1–14. doi:10.1155/2013/501851

100. KHANAL, S.K., XIE, B., THOMPSON, M.L., SUNG, S., ONG, S.K., Van, L.J. (2006): Fate transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. Environ Sci Technol 40.6537–6546.

101. KIDD, K. A., BLANCHFIELD, P. J., MILLS, K. H., PALACE, V. P., EVANS, R. E., LAZORCHAK, J. M. & FLICK, R. W., (2007):

Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(21). 8897–8901.

102. KIMBER, I., DEARMAN, R.J., (2010): An assesment of the ability of phthalates to influence immune and allergic response, Toxicology, 271:73-82, doi:10.1016/j.tox.2010.03.020

103. KONIECKI, D., WANG, R., MOODY, R.P., ZHU, J., (2011): Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure, Environmental Research, 111:329-336. doi:10.1016/j.envres.2011.01.013

104. LAI, K.M., JOHNSON, K.L., SCRIMSHAW, M.D., LESTER J.N., (2000): Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. Environmental Science Technology, 34:3890-3894

105. LATINI, G., SCODITTI, E., VERROTTI, A., FELICE, C.D., MASSARO, M., (2008): Hindawi Publishing Corporation, PPAR Research, 2008:13, doi:10.1155/2008/359267

106. LEGLER, J., ZEINSTRA, L. M., SCHUITEMAKER, F., LANSER, P. H., BOGERD, J., BROUWER, A., DICK VETHAAK, A., DE VOOGT, P., MURK, A.J., VAN DER Burg, B. (2002): Comparison of in Vivo and in Vitro Reporter Gene Assays for Short-Term Screening of Estrogenic Activity. Environmental Science & Technology, 36(20), 4410–4415. doi:10.1021/es010323a

107. Li, Y., SALLACH, J. B., ZHANG, W., BOYD, S. A., Li, H., (2018): Insight into the Distribution of Pharmaceuticals in Soil-

Water-Plant Systems. Water Research. doi:10.1016/j.watres.2018.12.039

108. LITVAK and JARDINE, (2003): Direct yolk sac volume manipulation of zebrafish embryos and the relationship between offspring size and yolk sac volume. J. Fish Biol. 63:388–397. https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00161.x

109. LIU, Y.Y., LIN, Y.S., YEN, CH.H., MIAW, CH.L., CHEN, T.CH., WU, M.CH., HSIEH, CH.Y., (2018): Identification, contribution, and estrogenic activity of potential EDCs in a river receiving concentrated livestock effluent in Southern Taiwan, Science of the Total Environment, 636:464-476. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.031

110. LORBER, M., SCHECTER, A., PAEPKE, O., SHROPSHIRE, W., CHRISTENSEN, K., BIRNBAUM, L., (2015): Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. Environmental International, 77: 55–62.

111. LU, Y., LI, J., MENG, J., ZHANG, J., ZHUANG, H., ZHENG, G., XIE, W., PING, L., SHAN, S., (2021): Long-term biogas slurry application increased antibiotics accumulation and antibiotic resistance genes (ARGs) spread in agricultural soils with different properties, Science of The Total Environment, 759:143473. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143473

112. MAES, J., VERLOOY, L., BUENAFE, O.E., de WITTE, P.A.M., ESGUERRA, C. V., CRAWFORD, A.D., (2012): Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in

Zebrafish Embryos and Larvae. PLoS One 7: 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850

113. MANSELL, D.S., BRYSON, R.J., HARTER, T., WEBSTER, J.P., KOLODZIEJ, E.P., SEDLAK, D.L. (2011): Fate of endogenous steroid hormones in steer feedlots under simulated rainfall-induced run off. Environ. Sci. Technol. 45. 8811–8818.

114. MARKEY, C.M., RUBIN, B.S., SOTO, A.M., SONNENSCHEIN, C., (2003): Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 83:235-244. doi:10.1016/S0960-0760(02)00272-8

115. MASTHARE, M.L., LEE, L.S., NIES, L.F., TURCO, R.F., (2013): Transformation of 17alfa-Estradiol, 17beta-Estradiol and Estrone in Sediments Under Nitrate- and Sulfate- Reducing Conditions, Environmental Science and Technology, 47:7178-7185.

116. MATSUSHIMA, A., LIU, X., OKADA, H., SHIMOHIGASHI, M., SHIMOHIGASHI, Y., (2010): Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ER-alfa but a highly specific antagonist for ER-beta, Environmental Health Perspective, 118:1267-1272. doi:10.1289/ehp.0901819

117. MAURYA, S., ABRAHAM, J.S., SOMASUNDARAM, S., TOTEJA, R., GUPTA, R., MAKHIJA, S., (2020): Indicators for assessment of soil quality: a mini- review, Environmental Monitoring and Assessment, 192:604, 10.1007/s10661-020-08556-z

118. MicroBioTest, (2018): Phytotoxkit Seed Germination and Early Growth Microbiotest with Higher Plants. Standard Operational Procedure, http://www.microbiotests.be/SOPs/Phytotoxkit_SOP_-A5.pdf

119. MILLER, M.F., CHERNYAK, S.M., BATTERMAN, S., LOCH-CARUSO, R., (2009): Polybrominated diphenyl ethers in human gestational membranes from women in southeast Michigan. Environmental Science Technology 2009; 43: 3042–3046. DOI: 10.1021/es8032764

120. MILLS, L.J., CHICHESTER, C., (2005): Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of the Total Environment, 343:1-34.

121. MSZ 21470:88. Hungarian Standard, (1993): Environmental Protection. Testing of Soils. Pseudomonas Fluorescens Soiltoxicity Test.

122. MSZ 21978:30. Hungarian Standard, (1988): Investigation of Hazardous Waste. Microbiological Test of Soil. Azotobacter Agile Dehydrogenase Enzyme Activity Test.

123. NADERI, M., WONG, M.Y.L., GHOLAMI, F., (2014): Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults, Aquatic Toxicology, 148:195-203. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.009

124. NEERU, N., (2000): Azotobacter in Sustainable Agriculture. Edited by Narula Neeru. New Delhi.

125. NELLES, J.L., HU, W.Y., PRINS, G.S. (2011): Estrogen action and prostate cancer. Expert Review Endocrinology Metabolism. 6. 437–451.

126. NET, S., DUMOULIN, D., EL-OSMANI, R., RABODONIRINA, S., OUDDANE, B., (2014): Case study of PAHs, Me-PAHs, PCBs,

Phthalates and Pesticides contamination in the Somme River water, France, International Journal of Environmental Research, 8(4):1159-1170.

127. NIRANJAN, M.K.; KOIRI, R.; SRIVASTAVA, R., (2019): *Expression of estrogen receptor alpha in response to stress and estrogen antagonist tamoxifen in the shell gland of <i>Gallus gallus domesticus</: Involvement of anti-oxidant system and estrogen. Stress, 1–31.* doi:10.1080/10253890.2019.1710127

128. Nitrates Directive The Council of the European Communities. Council Directive 91/676/EEC of 12 December Concerning the Protection of Waters against Pollution Caused by Nitrates from Agricultural Sources (1999)

129. NOWICKI, A., BARANSKI, W., BARYCZKA, A., JANOWSKI, T., (2017): OvSynch protocol and its modifications in the reproduction management of dairy cattle herds – an update. Journal of Veterinary Research. 61. (3) 329–336.

130. NSIBANDE, S.A., FORBES, P.B.C., (2016): Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials – A review, Analytica Chimica Acta, DOI: 10.1016/j.aca.2016.10.002

131. OBER, E.A., FIELD, H.A., STAINIER, D.Y.R., (2003): From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish 120, 5–18.

132. OKOUMASSOUN, L.E., BROCHU, CH., DEBLOIS, CH., AKPONAN, S., MARION, M., AVERILL-BATES, D., DENIZEAU, F., (2002): Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Oueme river in Republic of Benin, The Science of the Total Environment, 299:163-172.

133. ONOZUKA, D., YOSHIMURA, T., KANEKO S, FURUE, M., (2009): Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans: a 40-year follow-up study of Yusho patients. American Journal of Epidemiology, 169: 86–95.

134. OTTINGER, M.A.; QUINN JR., M.J.; LAVOIE, E.; ABDELNABI, M.A.; THOMPSON, N.; HAZELTON, J.L.; WU, J.M.; BEAVERS, J.; JABER, M., (2005): Consequences of endocrine disrupting chemicals on reproductive endocrine function in birds: Establishing reliable end points of exposure. Domestic Animal Endocrinology, 29, 411–419.

135. OWCZAREK, K, KUBICA, P., KUDLAK, B., RUTKOWSKA, A., KONIECZNA, A., RACHON, D., NAMIESNIK, J., WASIK, A., (2018): Determination of trace levels of eleven bisphenol A analogues in human blood serum by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Science of the Total Environment, 628–629: 1362–1368.

136. PAGÁN, O.R., COUDRON, T., KANERIA, T., (2009): The Flatworm Planaria as a toxicology and behavioral pharmacology animal model in undergraduate research experiences, The Journal of Undergraduate Neuroscience Education (JUNE), 7(2): A48-A52.

137. PAULSEN, I.T., PRESS, C.M., RAVEL, J., KOBAYASHI, D.Y., MYERS, G.S.A., MAVRODI, D.V., DEBOY, R.T., et al (2005): Complete Genome Sequence of the Plant Commensal Pseudomonas Fluorescens Pf-5. Nature Biotechnology 23(7):873–78. https://doi.org/10.1038/nbt1110

138. PETRIE, B., Mc ADAM, E.J., SCRIMSHAW, M.D., LESTER, J.N., CARTMELL, E. (2013): Fate of drugs during wastewater treatment. TrAC Trends Anal. Chem. 49. 145–159.

139. PLOTAN, M., ELLIOTT, C.T., FRIZZEL, C., CONNOLLY, L., (2014): Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health. Food Chem. 159. 157–165.

140. RAECKER, T., THIELE, B., BOEHME, R.M., GUENTHER, K., (2011): Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies, Chemosphere, 82:1533-1540. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.065

141. RAND, M.D., (2010): Drosophotoxicology: The growing potentialfor Drosophila in neurotoxicology. Neurotoxicology and Teratology, 32:74–83.

142. REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 December 2006: Official Journal of the European Union, 136/3-280.

143. REINLI, K., BLOCK, G., (1996): Phytoestrogens content of foods-A compendium of literature values, Nutrition and Cancer, Vol. 26, No. 2.

144. RICCI, A., LI, M., FRICKE, P.M., CABRERA, V.E., (2020): Short communication: Economic impact among 7 reproductive programs for lactating dairy cows, including a sensitivity analysis of the cost of hormonal treatments. Journal of Dairy Science. 103. (6) 5654–5661.

145. ROCHESTER, J.R., (2013): Bisphenol A and human health: A review of the literature, Reproductive Toxicology, 42:132-155. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008

146. ROSE, J., HOLBECH, H., LINDHOLST, C., NRRUM, U., POVLSEN, A., KORSGAAD, B., BJERREGAARD, P., (2002): Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry Physiology Part C. 131:531–539.

147. ROUILLER-FABRE, V., GUERQUIN, M. J., TUMBA-BYN, T., MUCZYNSKI, V., MOISON, D., TOURPIN, S., MESSIAEN, S., HABERT, R., LIVERA, G., (2015): Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors in Fetal and Neonatal Testes: A Gapped Landscape. Frontiers in Endocrinology, 6. doi:10.3389/fendo.2015.00058

148. ROUILLER-FABRE, V., HABERT, R., LIVERA, G., (2014): Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis, Annales dEndocrinologie, 75:54-57. https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.010

149. 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.

150. RUDEL, R.A., DODSON, R.E., PEROVICH, L.J., MORELLO-FROSCH, R., CAMANN, D.E., ZUNIGA, M.M., YAU, A.Y., JUST, A.C., BRODY, J.G., (2010): Semivolatile endocrine-disrupting compounds in paired indoor and outdoor air in two

northern California communities. Environmental Science Technology, 44: 6583–6590

151. RUIZ, G.W., BRYAN, G.W., GIBBS, P.E., (1994): Chronic toxicity of water tributyltin (TBT) and copper to spat of the bivalve Scrobicularia plana: ecological implications, Marine Ecology Progress Series, 113:105-117.

152. RUTISHAUSER, B.V., PESONEN, M., ESCHER, B. I., ACKERMANN, G. E., AERNI, H.R., SUTER, M. J.-F., and EGGEN, R.I.L., (2004): Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 857–864.

153. SAMMAD, A., UMER, S., SHI, R., ZHU, H., ZHAO, X., WANG, Y., (2019): Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 104. (4) 678–986.

154. SAMSIDAR, A., SIDDIQUEE, S., SHAARANI, S.M., (2018): A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs, Trends in Food Science & Technology, 71:188-201. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.011

155. SANDOR, T., MEHDI, A.A., (1979): Steroids and evolution in hormones and evolution, Edited by Barrington E.J.W. Academic Press, London, 1-72.

156. SCHAFER, T.E., LAPP, C.A., HANES, C.M., LEWIS, J.B., WATAHA, J.C., SCHUSTER, G.S., (1998): Estrogenicity of

bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro, Journal of Biomedical Materials Research, 45: 192-197.

157. SCHIEDEK, T., (1995): Impact of plasticizers (phthalic acid esters) on soil and groundwater quality, Groundwater Quality: Remediation and Protection (Proceedings of the Prague Conference, May 1995) 225.

158. SCHUBERT, S., KEDDIG, N., HANEL, R., KAMMANN, U., (2014): Microinjection into zebrafish embryos (Danio rerio) - a useful tool in aquatic toxicity testing? Environ. Sci. Eur. 26. https://doi.org/10.1186/s12302-014-0032-3

159. SHARMAN, M., READ, W.A., CASTLE, L., GILBERT, J., (1994): Levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter, and cheese, Food Additives and Contaminants, 11(3):375-385.

160. SHARPE, R.M., SKAKKEBAEK, N.E., (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? The Lancet, 341:1392-1396.

161. SHI, W., WANG, L., ROUSSEAU, D.P., LENS, P.N. (2010): Removal of estrone, 17α-ethinylestradiol, and 17ß-estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. Environ. Sci. Pollut. Res. 17. 824–833.

162. SHRESTHA, S.L., CASEY, F.X., HAKK, H., SMITH, D.J., PADMANABHAN, G., (2012): Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils. Environmental Science.Technology, 46. 11047–11053.

163. SIDDIQUE, H.R., CHOWDHURI, D.K., SAXENA, D.K., & DHAWAN, A. (2005): Validation of Drosophila melanogaster as

an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. Mutagenesis, 20(4), 285–290. doi:10.1093/mutage/gei032

164. SILVERMAN, W.A., (2002): The schizophrenic career of a ‘monster drug’. Pediatrics 2002; 110: 404–406.

165. SIMON L. (szerk.), (1999): Talajszennyeződés, talajtisztítás. Környezetügyi Műszaki Gazdasági Tájékoztató, 5. kötet. Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest.

166. SIMONEIT, B.R.T., MEDEIROS, P.M., DIDYK, B.M., (2005): Combustion products of plastics as indicators for refuse burning in the atmosphere, Environmental Science Technology, 39:6961-6970.

167. SINGH, S.P., SINGH, M.K., (2020): Soil Pollution and Human Health, Plant Responses to Soil Pollution, 205-220. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4964-9_13

168. SONNENSCHEIN, C., SOTO, A.M., (1998): An uptake review of environmental estrogens and androgens mimics and antagonists. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 65, No. 1-6, 143-150.

169. STEFANOVITS P. (1992): Talajtan, Mezőgazdasági Kiadó, Harmadik kiadás, Budapest.

170. STOCKHOLM CONVENTION, (2001): Chapter XXVII-Environment – 15. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Stockholm, 22 May 2001.

171. STORK, N.E., (2010): Re-assessing current extinction rates, Biodiversity and Conservation, 19:357-371. DOI 10.1007/s10531-009-9761-9

172. SUN, J., PAN, L., TSANG, D.C.W., ZHAN, Y., ZHU, L., LI, X., (2018): Organic contamination and remediation in the agricultural soils of China: A critical review, Science of The Total Environment, 615:724-740. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.271

173. SUZUKI, Y., YOSHINAGA, J., MIZUMOTO, Y., SERIZAWA, S., SHIRAISHI, H., (2012): Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. Int J Androl, 35: 236–244. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2011.01190.x

174. SWAN, S.H., MAIN, K.M., LIU, F., STEWART, S.L., KRUSE, R.L., CALAFAT, A.M., MAO, C.S., REDMON, J.B., TERNAND, CH.L., SULLIVAN, S., TEAGUE, J.L., (2005): Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environmental Health Perspect, 113:1056–1061.

175. TANKIEWICZ, M., FENIK, J., BIZIUK, M., (2011): Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides water samples: A review, Talanta, 86:8-22. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.056

176. TAO, T., PENG, J., (2009): Liver development in zebrafish (Danio rerio). J. Genet. Genomics 36, 325–334. https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60121-6

177. TAYLOR, K.W., NOVAK, R. F., ANDERSON, H. A., BIRNBAUN, L. S., BLYSTONE, C., DE VITO, M., JACOBS, D., KÖHRLE, J., LEE, D.H., RYLANDER, L., RIGNELL-HYDBOM, A., TORNERO-VELEZ, R., TURYK, M.E., BOYLES, A.L., THAYER, K.A., Lind, L. (2013): Evaluation of

the Association between Persistent Organic Pollutants (POPs) and Diabetes in Epidemiological Studies: A National Toxicology Program Workshop Review. Environmental Health Perspectives, 121(7), 774–783. doi:10.1289/ehp.1205502

178. TEMPFER, C.B., SCHULTHEIS, B., HILAL, Z., DOGAN, A., REZNICZEK, G., (2017): Thalidomide and lenalidomide for recurrent ovarian cancer: a systematic review of the literature. Oncol Lett, 14: 3327–3336.

179. THIELE, B., GÜNTHER, K., SCHWUGER, M.J., (1997): Alkylphenol Ethoxylates: Trace analysis and environmental behavior, Chemical Reviews, 97(8):3247-3272, doi: 10.1021/cr970323m.

180. TORRES PADRÓN, M. E., SOSA FERRERA, Z., SANTANA RODRÍGUEZ, J.J., (2006): Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC-UV for the determination of organochlorine pesticides and their metabolites in environmental liquid samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386(2): 332–340. doi:10.1007/s00216-006-0626-8

181. TROISI, R., HATCH, E.E., TITUS, L, STROHSNITTER, W., GAIL, M.H., HUO, D., ADAM, E., ROBBOY, S.J., HYER, M., HOOVER, R.N., PALMER, J.R., (2017): Prenatal diethylstilbestrol exposure and cancer risk in women. Environmental and Molecular Mutagenesis. DOI: 10.1002/ em.22155

182. TYLER, C.R., Van AERLE, R., HUTCHINSON, T.H., MADDIX, S., TRIP, H. (1999): An in vivo testing system for endocrine

disruption in fish early life stagesusing induction of vitellogenin. Environmental Toxicology Chemistry, 18.337–347.

183. UNEP Chemical Branch, DTIE, (2010): International POPs Elimination Network, United Nations Environment Programme, Geneva, Switzerland.

184. VALVI, D., MONFORT, N., VENTURA, R., CASAS, M., SUNYER, J., VRIJHEID, M., (2015): Variability and predictors of urinary phthalate metabolites in Spanish pregnant women. Int J Hyg Envir Heal, 218: 220–231. DOI: 10.1016/j.ijheh.2014.11.003

185. VAN DONK, E., PEACOR, S., GROSSER, K., DOMIS, L.N.D.S., LÜRLING, M. (2016): Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. In: de Voogt, P. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, Heildeberg, Germany. 91–105.

186. VANDERBERG, L.N., HAUSER, R., MARCUS, M., OLEA, N., WELSHONS, V., (2007): Human exposure to bisphenol A (BPA), Reproductive Toxicology, 24:139-177.

187. VERMES L. (1995): A talajszennyezettség megelőzésének, illetve felszámolásának jelentősége és lehetőségei. Agrokémia és Talajtan

188. VERSTEEG, D.J., STALMANS, M., DYER, S. D., & JANSSEN, C. (1997): Ceriodaphnia and daphnia: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. Chemosphere, 34(4), 869–892. doi:10.1016/s0045-6535(97)00014-3

189. VIGANÓ, L., BENFENATI, E., CAUWENBERGE, A.V., EIDEM, J.K., ERRATICO, C., GOKSOYR, A., KLOAS, W.,

MAGGIONI, S., MANDICH, A., URBATZKA, R., (2008): Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. Chemosphere, 73(7), 1078-1089.

190. VOM SAAL, F. S., AKINGBEMI, B. T., BELCHER, S. M., BIRNBAUM, L. S., CRAIN, D. A., ERIKSEN, M., … ZOELLER, R. T., (2007): Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. Reproductive Toxicology, 24(2):131–138. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.00

191. VONIER, P.M., CRAIN, D.A., MCLACHLAN, J.A., GUILLETTE, L.J., ARNOLD, S.F., (1996): Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the oviduct of the American aligator. Environmental Health Perspectives, 104:1318-1322.

192. VOS, J.G., DYBING, E., GREIM, H.A., LADEFOGED, O., LAMBRÉ, C., TARAZONA, J.V., BRANDT, I., VETHAAK, A.D., (2000): Health effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Critical Reviews in Toxicology, 30(1):71-133.

193. VOULVOULIS, N., SCRIMSHAW, M. (2002): Methods for the determination of endocrine disrupters. in: Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process, (Eds.) Birkett, J.W., Lester, J.N., IWA publishing, Lewis publisher. Boca Raton London, New York Washington, D.C, 59-102, ISBN9780429143182

194. WATANABE, S., YAMAGUCHI, M., SOBUE, T., TAKAHASHI, T., MIURA, T., ARAI, Y., MAZUR, W., WAHALA, K., ADLERCREUTZ, H., (1998): Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (Kinako), Human Nutrition and Metabolism, American Society for Nutritional Sciences.

195. WEI, H., YAN-XIA, L., MING, Y., (2011): Presence and determination of manure-borne estrogens from dairy and beef cattle feeding operations in Northeast China, The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 86:465-469.

196. WHITE, R., (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, Endocrinology, 135(1):175-182.

197. WOCLAWEK-POTOCKA, I., MANNELLI, C., BORUSEWSZKA, D., KOWALCZYK-ZIEBA, I., WASNIEVSKI, T.,SKARZINSKY, D.J., (2013): Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model, International Journal of Endocrinology, http://dx.doi.org/10.1155/2013/650984.

198. WONG, K.H., and DURRANI, T.S., (2017): Exposures to endocrine disrupting chemicals in consumer products – a guide for pediatricians. Curr Prob Pediatr Ad; 47: 107–118.

199. WRITER, J.H., RYAN, J.N., KEEFE, S.H., BARBER, L.B., (2012): Fate of 4-nonylphenol and 17β-estradiol in the Redwood River of Minnesota. Environmental Science Technology, 46:860–868.

200. XUAN, R., BLASSENGALE, A.A., WANG, Q., (2008): Degradation of estrogenic hormones in a siltloam soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56:9152–9158.

201. YING, G. G. & KOOKANA, R. S., (2005): Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil, Environmental Toxicology and Chemistry, 24(10): 2640–2645.

202. YING, G.G., KOOKANA, R. S., RU Y.J., (2002): Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. Environment International 28. 545-551.

203. YING, G.G., KOOKANA, R.S., DILLON, P., (2003): Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. Water Research, 37:3785–3791.

204. ZHANG, F., XIE, Y., LI, X., WANG, D., YANG, L., NIE, Z., (2015). Accumulation of steroid hormones in soil and its adjacent aquatic environment from a typical intensive vegetable cultivation of North China, Science of the Total Environment, 538:423–430.

205. ZHENG, W., YATES, S.R., BRADFORD, S.A., (2008): Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system. Environ Sci Technol 42:530–535.

206. ZHONG, M., YIN, P., ZHAO, L., (2017): Nonylphenol and octylphenol in riverine waters and surface sediments of the Pearl River estuaries, South China: occurrence, ecological and human health risks. Water Science and Technology, Water Supply, 17(4):1070–1079.

207. ZHOU, J., ZHU, X.S., CAI, Z.H., (2008): Endocrine disruptors: an overview and discussion on issues surrounding their impact on marine animals, Journal of Marine Animals and Ecology, Vol.2:2.

208. ZOELLER, R.T., BROWN, T.R., DOAN, L.L., GORE, A.C., SKAKKEBAEK, N.E., SOTO, A.M., WOODRUFF, T.J., VOM SAAL, F.S., (2012): Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A statement of principles from the Endocrine Society. Endocrinoligy, 153(9):4097-4110. doi: 10.1210/en.2012-1422

209. ZOELLER, R.T., BROWN, T.R., DOAN, L.L., GORE, A.C., SKAKKEBAEK, N.E., SOTO, A.M., WOODRUFF, T.J., VOM SAAL, F.S., (2012): Endocrine-Disrupting Chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society, Endocrinology, 153(9):4097-4110.

210. ZUO, Y., ZHANG, K., ZHOU, S., (2013): Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17α-ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, acase study. Environmental Science, Processes and Impacts, 15.1529–1535.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a doktori dolgozatom elkészítésében valamilyen formában a segítségemre voltak. Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Szakál Pál professzor emeritusznak és Dr. Plutzer Juditnak a szakmai támogatásukért és hogy biztosították a doktori kutatásomhoz a laboratóriumi feltételeket. Szeretnék köszönetet mondani a Nemzeti Népegészségügyi Központ, Vízhigiénés Osztály valamennyi munkatársának, akik segítségemre voltak a kutatási idő alatt.

Köszönettel tartozom Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak a MATE - Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársának a haltesztek elvégzéséért és a közös munkáért.

Köszönet illeti Dr. Szabó Lilit az MTA - Csillagászati és Földtudományi Kutatóközpont munkatársát az analitikai mérések elvégzéséért és a közös munkáért.

Köszönöm a munkahelyemnek, vezetőimnek, hogy lehetővé tették számomra, hogy tanulmányaimat végezni tudjam.

Külön köszönöm Molnár Tibornak a szakmai visszajelzéseket és segítségét.

Köszönöm szüleim, testvérem és barátaim támogatását.

Kutatási munkám támogatását köszönöm az Innovációs és Technológiai Minisztérium, valamint az Új Nemzeti Kiválósági Programnak: (ÚNKP-19-3-I-SZE-3; ÚNKP-20-3-II-SZE-18; ÚNKP-21-3-II-SZE-6).