Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Mosonmagyaróvár
2022

Széchenyi István Egyetem
Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar
Wittman Antal Növény-, Állat- és Élelmiszertudományi
Multidiszciplináris Doktori Iskola
Vízgazdálkodási és Természeti Ökoszisztémák Tanszék

Tézisfüzet

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

Témavezető:
Prof. Dr. Szakál Pál
professor emeritus
SZE AKMK

Társ-témavezető:
Dr. Plutzer Judit
Nemzeti Népegészségügyi
Központ

Doktori Iskola
vezetője:
Prof. Dr. Varga László
egyetemi tanár

Programvezető:
Prof. Dr. Pinke Gyula
egyetemi tanár

készítette:
Gubó Eduard
doktorandusz hallgató
Mosonmagyaróvár,
2022

I. Bevezetés

Az ösztrogénhatású vegyületek (Endocrine disrupting chemicals, EDCs) mint mikroszennyezők növekvő jelenléte a környezetünkben egyre nyilvánvalóbb. Ezek sokszor ipari eredetűek (pl. műanyagok lágyítószerei), lehetnek emberi eredetűek (pl. fogamzásgátló-metabolitok a szennyvízben), de sajnos növekvő mértékben lehet forrásuk az intenzív mezőgazdaság is. Az intenzív állattartó telepeken keletkező hígtrágya, mint melléktermék nemcsak értékes tápanyagokat tartalmaz, hanem antibiotikumokat, gyulladáscsökkentő gyógyszereket és a már említett ösztrogénhatású vegyületeket is, melyek elsősorban a normál hím nemi funkciókat károsíthatják leginkább. A károsító hatás kiterjedhet a vízi élővilágra, a vadon élő állatokra is.

Az EDC-vegyületek a hígtrágya kijuttatásával bejuthatnak a szántóföldek talajába, ahol a termesztett növények felvehetik ezeket, így bekerülhetnek az emberi táplálékláncba, sőt a tápláléklánc csúcsán álló emberbe is. Az EDC-vegyületek természetes vizekben, folyókban, majd ivóvízben való megjelenése egyre közismertebb, ugyanakkor a hormonálisan programozott intenzív állattartás – hígtrágyakijuttatás – növénytermesztés – növényi termés, benne EDC-vegyületekkel útvonal egyáltalán nem közismert. A dolgozat ebbe a témába nyújt betekintést.

A vizsgálatokhoz a mintavételezés egy Pest megyei intenzív tejelőtelepen történt, 2017 és 2020 között. Negyedéves gyakorisággal mintáztuk a hígtrágyatároló medence tartalmát, megvizsgálva annak

ösztrogéntartalmát egy holisztikus (YES-teszt) és egy műszeres analitikai (UHPLC-FLD) módszerrel. Az eredményeket összevetettük a telep szaporodásbiológiai adataival, és statisztikai módszerekkel összefüggéseket kerestünk a hormoninjekciók felhasználása és a hígtrágya EDC-tartalmának alakulása között. Különböző tesztmódszerekkel vizsgáltuk az ösztrogénhatású vegyületek megjelenését, felhalmozódását.

II. Célkitűzések, hipotézisek

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.

III. Az alkalmazott módszerek

Kutatásunkat egy Pest megyei intenzív tejelő szarvasmarhatelepen végeztük. A tejhasznú szarvasmarha-állományokban egyre gyakoribb a fel nem ismert ivarzás; ezért, valamint a folyamatos tejtermelés érdekében célirányos tenyésztési programokat alkalmaznak. Ezen programok előnye, hogy a hormoninjekciók hatására a tehenek időzítetten termékenyíthetőek. Hátránya ugyanakkor, hogy a hígtrágyában az ösztrogénvegyületek

szintje megemelkedik, és ez a szántóföldre történő kijuttatást követően szennyezésként jelenhet meg mind a talajban, mind az azon termesztett növények különböző részeiben. Ez egyrészt jelentheti a természeti környezet szennyezését (talajvíz, vadon élő állatok), másrészt a betakarított termésen ill. takarmányon keresztül a táplálékláncba való bekerülést. A témát ilyen átfogóan és a jelen kutatáshoz hasonló részletességgel még nem vizsgálták.

Mivel jelen kutatómunka úttörő jellegű, ezért a vizsgálatokhoz használt módszerek jó részét előbb adaptálni kellett. Fő vizsgálati módszer az ISO 19040-1:2018 szabvány alapján kidolgozott YES-teszt (Yeast Estrogen Screen) volt, melynek alapja, hogy a humán ösztrogénreceptort (hERα) tartalmazó, génmódosított *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 élesztőtörzs ösztrogénhatású anyagok jelenlétében, CPRG (klórfenolvörös-ß-D-galaktopiranozid) szubsztrát segítségével vörös színű terméket ad, mely 580 nm-en fotometrálható.

Ezt az alapvetően holisztikus eredményt nyújtó (össz-ösztrogénszintet mérő) vizsgálatot sok esetben specifikus műszeres analitikai mérésekkel (UHPLC-FLD, ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia-fluoreszcens detektor) egészítettük ki, konkrét vegyületekre kiterjedően. A vizsgált ösztrogénhatású vegyületek: E1, 17αE2, 17ßE2, EE2, E3. Ezen módszerekkel megmértük a telepen alkalmazott 5-féle ivarzásindukáló hormoninjekció (Alfaglandin, PGF, Dinolytic, Gonavet, Ovarelin) és ezen belül 3 hatóanyag (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) valamint 2 segédanyag (benzil-alkohol és klórkrezol) ösztrogénhatását.

Valamennyi mintára kiterjedő vizsgálat:

- YES-teszt
- UHPLC vizsgálat

A minták egy részére kiterjedő, kiegészítő vizsgálat (toxikológiai tesztek):

- Zebradánió-teszt: transzgénikus zebradánió (*Brachydanio rerio* Tg(vtg mCherry)) fluoreszcenciateszt vitellogenin kimutatására,
- Csírázásgátlási teszt (ISO 18763 alapján) fitotoxicitás vizsgálatára öt növényfaj (kerti zsázsa, fehér mustár, szemescirok, hajdina, tritikálé) esetében
- *Daphnia magna* 48-órás akut immobilizációs teszt
- Alga növekedésgátlási teszt (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
- *Azotobacter agile* teszt (MSZ21978-30:1988) Veszélyes hulladékok vizsgálata
- *Pseudomonas fluorescens* (MSZ21470-88:1993) talajtoxicitási teszt

IV. Eredmények és értékelésük

- Vizsgálataink szerint folyamatosan emelkedtek a hígtrágya EEQ értékei, különösen a 2018-as protokollváltás után.
- Az ösztrogének sokkal erősebben (akár 5-6-szoros mértékben) kötődhetnek az iszapfázishoz, mint a felülúszóhoz.
- Kutatásunk során 5 db ivarzás indukálásra használt készítményt vizsgáltunk meg (Ovarelin, Gonavet, PGF,

Alfaglandin, Dinolytic). Valamennyi ösztrogénhatásúnak bizonyult. A legmagasabb EEQ értéket az Alfaglandin és a PGF mutatta.

- Az olaszperje termesztése során azt tapasztaltuk, hogy a talaj EEQ értéke előbb csökken, majd a tavaszi N-fejtrágyázás után emelkedik. Hasonló tendencia figyelhető meg a növényben is: a fejtrágyázás után az EEQ érték ugrásszerűen megnő, majd csökkenő növekedési ütem mellett betakarításkor mutatja a legmagasabb értéket. Ez a magas EEQ érték az erjesztés teljes időtartamában (kb. 200 nap) kimutatható volt.
- A kukorica termesztése során hasonló tendenciákat figyeltünk meg, mint az olaszperje esetében. A különbségek a következők: alacsonyabb dózisú N-fejtrágyázás után kisebb mértékű volt az EEQ érték növekedése. Míg a talaj EEQ értéke folyamatosan csökkent, addig a gyökéré jelentősen emelkedett. A hajtásban és a szemtermésben viszonylag alacsony értékeket mértünk. A betárolt tömegtakarmány az erjesztés után szintén megőrizte ösztrogénhatását.
- Csenki és munkatársai (2021) módszerével transzgénikus Zebradánió tesztet hajtottunk végre, melynek során 4 különböző tejelő szarvasmarhatelep mindegyikének hígtrágyájából kimutattuk az ösztrogének jelenlétét.
- Vizsgálataink során 5 db szteroid ösztrogént (E1, β-E2, α-E2, 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.

- Kimutattuk, hogy a gyökér nagyobb mértékben akkumulálja az EDC-ket, mint a hajtás, de utóbbi EDC tartalma még így is aggasztóan magas.
- A toxikológiai tesztek során a nagy hígítású hígtrágya nem gyakorolt gátló hatást, hasonlóan a kissé töményebb, de szeparált hígtrágyához.
- A két talajtoxicitási teszt és a Daphnia immobilizációs teszt során nem tapasztaltunk negatív hatásokat. Ezzel szemben alga esetében a hígítás és a szeparálás csökkenti a kezdetben szinte teljesen gátló hatást.
- A csíratesztekben szereplő 5 növényfaj közül 4-re (fehér mustár, kerti zsázsa, hajdina, tritikálé) csak az 50-100x-os hígítású hígtrágya nem gyakorolt gátló hatást. Legellenállóbnak a szemescirok bizonyult.

V. 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, α-E2, β-E2, 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 gyökér és 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 β-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.

VI. Következtetések és 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, anaerób 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.

Eredményeink alapján a következő javaslatokat fogalmazzuk meg a gyakorlat számára:

1. Vizsgálataink alapján a hígtrágya és termény hormonmentesítése már a gyógyszerválasztással kezdődik. Olyan gyógyszert érdemes választani, amely szinerg segédanyag segítségével éri el a magas **látszólagos hormonhatást**.

2. Mivel kimutattuk, hogy az EDC vegyületek jobban kötődnek a hígtrágya szilárd fázisához, ezért a gyakorlat számára a **szeparátor használata** tűnik a hormonmentesítés legpraktikusabb és leginkább költséghatékony eszközének.

3. Eredményeink azt mutatják, hogy a hígtrágya mind szeparált formában, mind anélkül egyenesen serkentette a **szemescirok** növekedését, ezért a hígtrágyával kezelt területeket első kultúraként érdemes szemescirokkal hasznosítani.

VII. Publikációs lista

Angol nyelvű folyóiratcikkek:

Csenki, Zs., **Gubó, E**., Garai, E., Bakos, K., Sipos, D.K., Urbányi, B., Plutzer, J., (2022): Microinjection based zebrafish embryo test for the detection of estrogenic substances in slurry based irrigation water and its combined application with yeast estrogen screen; ***Agricultural Water Management***; 272; https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107830, **(Q1, 6,5 IF)**.

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***; 7:97-110; https://doi.org/10.1007/s40974-021-00234-1, **(Q2, 3,8 IF)**.

Magyar nyelvű folyóiratcikkek:

Gubó, E., Molnár, T., Szakál, P., Pordán-Háber, D., Bede-Fazeka, Á., Plutzer, J., (2022): Szarvasmarhatartó telepen alkalmazott ivarzásindukáló hormonok megjelenése a hígtrágyában, ***Agrokémia és Talajtan***, pp 1-20, DOI: 10.1556/0088.2022.00116, **(Q4, 0,3 IF).**

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2019): Ösztrogének és ösztrogénhatású anyagok a növénytermesztésben; ***Agrokémia és Talajtan***; 68:385-401; https://doi.org/10.1556/0088.2019.00002, **(Q4, 0,4 IF)**.

<u>Nemzetközi konferenciarészvétel:</u>

Csenki, Zs., Garai, E., **Gubó, E**., Bakos, K., Vásárhelyi, E., Kánainé Sipos, D., Urbányi, B., Plutzer, J., (2020): Investigation of hormone-disrupting substances in slurry-based irrigation waters: the combined application of yeast and fish test; ***11th European Zebrafish Meeting***; 2020.10.26-27.

<u>Magyar nyelvű konferenciarészvétel:</u>

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2022): Szarvasmarha hígtrágya, talaj és növénykivonatok EDC (Endocrine Disrupting Compound) tartalmának meghatározása analitikai mérésekkel, ***XXV. Tavaszi Szél Konferencia***, **(Szekció 2. helyezés).**

Gubó, E., Szakál, P., (2022): Szarvasmarha hígtrágya, talaj és növénykivonatok EDC (Endocrine Disrupting Compound) tartalmának meghatározása analitikai mérésekkel, ***ÚNKP Konferncia 2021/2022***.

Csenki, Zs., **Gubó, E**., Garai, E., Bakos, K., Vásárhelyi, E., Kánainé Sipos, D., Plutzer, J., (2020): Hormonmoduláns anyagok hatásoldalról történő vizsgálata hígtrágyaalapú öntözővizekben transzgenikus zebradánió (Daniorerio) és élesztő (Saccharomycescerevisiae) modell segítségével; ***X. Ökotoxikológiai Konferencia***.

Gubó, E., Szakál, P., (2021): Szarvasmarha hígtrágya EDC (Endocrine Disrupting Compound) tartalma és a telepen alkalmazott ivarzás indukáló gyógyszerek közötti összefüggések vizsgálata, ***ÚNKP Konferencia, 2020/2021***, pp 129-135.

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2020): Ösztrogénhatású anyagok vizsgálata a mezőgazdaságban az élesztőteszt (YES) segítségével, ***XXIII. Tavaszi Szél Konferencia***, pp 34. **(Szekció 3. helyezés)**

Gubó, E., Szakál, P., (2020): YES (Yeast Estrogen Screen) teszt adaptálása különböző talajminták EDC (Endocrine Disrupting Compound) meghatározására, ***ÚNKP Konferencia, 2019/2020***, pp 197-204.

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2019): Ösztrogének és ösztrogénhatású gyógyszerek jelenlétének vizsgálata tejelőszarvasmarha-telepek hígtrágyájában, **OTDK-Debrecen**. **(Szekció 1. helyezés)**

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2019): Ösztrogénhatású anyagok vizsgálata a növénytermesztésben: a hígtrágya-termőföld és takarmánynövény rendszerben, ***TOX'19 Tudományos Konferencia***, p 42.

Garai, E., **Gubó, E**., Csenki, Zs., Bakos, K., Balogh, E., Urbányi, B., Plutzer, J., (2018): Hormonhatású anyagok vizsgálata hígtrágya alapú öntözővizekben: az élesztőteszt és halteszt együttes alkalmazása, ***TOX'18 Tudományos Konferencia***, p 56.

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2018): Ösztrogének és ösztrogénhatású gyógyszerek jelenlétének vizsgálata tejelő szarvasmarha-telepek hígttrágyájában, ***TOX'18 Tudományos Konferencia***, p 58.

Gubó, E., Szakál, P., Plutzer, J., (2018): Szarvasmarha hígtrágya ösztrogén tartalma szeparátor alkalmazása előtt és után, ***XXXVII. Óvári Tudományos Napok***, pp 411-420.

Gubó, E., Plutzer, J., Szakál, P., (2017): Ösztrogének és ösztrogénhatású gyógyszerek jelenlétének vizsgálata tejelőszarvasmarha-telepek hígtrágyájában, ***A Magyar Hidrológiai Társaság XXXV. Országos Vándorgyűlése,*** pp 1-20.

<u>Egyéb, a témában megjelent közlemények:</u>

Pordán-Háber, D., Kalocsai, R., Vona, V., **Gubó, E**., Szakál, T., (2021): A kritikusan fontos antibiotikumok (CIA) állategészségügyi alkalmazásának környezettoxikológiai jelentősége és hatása a víz-talaj kontinuumra, ***Acta Agronomica Óváriensis***.