

Halogénezett szénhidrogének hatása a madártojásra: egy klórbenzollal végzett alapkísérlet

Molnár Gy., Soós K., Kosznai N., Juhász A., Petri A., Tóth R., Molnár J., Gáspár L., Vetró O. és Gálfi M.

Molnár, Gy., Soós, K., Kosznai, N., Juhász, A., Petri, A., Tóth, R., Molnár, J., Gáspár, L., Vetró, O. and Gálfi, M. 2000. Effects of halogenic hydrocarbon chemicals on birds' eggs: a base experiment with chlorobenzenes. – Ornis Hung. 10: 231-235.

Halogenized hydrocarbon xenobiotics (pesticides, insecticides) accumulate in the soil, pollute ground waters and appear in elevated concentrations in biological systems (e.g. in animal tissues). The aim of this study was to examine the effects of chlorobenzene, chosen as a standard halogenized hydrocarbon compound, on an *in vitro* model system. We measured the thickness, structure and Ca^{2+} content of eggshells subjected to different chlorobenzene concentrations. Chicken (*Gallus domesticus*) eggs (containing 2-day-old embryos) were placed for 14 days in soil contaminated with chlorobenzene. We found a negative correlation between the thickness of the shell and the chlorobenzene concentration. The microscopic changes in the structure of the shells' outer and inner surface was related to the altered Ca^{2+} content.



Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a halogénezett szénhidrogén xenobiotikumok (peszticidek, inszekticidek stb.) körülbelül 25 éve kezdtek felhalmozódni a talajban és szennyezték a talajvizet. Koncentrációjuk nőtt a biológiai rendszerekben (pl. az állati szövetekben), így a vadon élő madarakban is. Jelen tanulmányunkkal célunk az volt, hogy a klórbenzoloknak – mint standard-nak választott halogénezett szénhidrogén vegyületeknek – vizsgáljuk hatásait *in vitro* modellrendszerekben. Modellkísérleteinkben a kezelt tojáshéjak vastagságát, struktúráját és kalcium-tartalmát detektáltuk. Kerestük az összefüggést a fenti paraméterek klórbenzol jelenlétében mért változásai és a tojáshéjak szerkezete között. Kísérleteink során *in vitro* modellrendszerünkben házi tyúk (*Gallus domesticus*) 2 napos embriókat tartalmazó tojásait klórbenzollal szennyezett talajba helyeztük 14 napra. Mérési eredményeink szerint a tojáshéjak vastagságának változása a klórbenzol koncentrációval korrelálható. A tojáshéjak külső és belső felszíni változásai a Ca^{2+} -tartalmuk módosulásaival hozhatók összefüggésbe.

M. Gy., S. K., K. N., J. A., P. A., T. R., M. J., G. L., V. O., G. M.: SZTE JGYTF Kar, Biológia Tanszék és Szentgyörgyi Albert Orvostudományi Egyetem, 6725 Szeged, Boldogasszony sgt. 6.

1. Bevezetés

Ismeretes, hogy a klórozott szénhidrogének felhalmozódnak a talajban, a természetes vizekben és az élő rendszerekben. A madarak mint kiváló nyomjelzői a táplálékláncban deponálódó perzisztens toxikus vegyületeknek, alkalmas vizsgálati rendszert képviselnek ezen kemikáliák

(peszticidek, inszekticidek) élettani hatásainak vizsgálatára. (Molnár *et al.* 1999, Soós *et al.* 2000). A fehérfejű rétisasnál (*Haliaeetus leucocephalus*) mint csúcsragadozónál Kanadában Elliott (1996) szerves klórvegyületek és nehézfém-komplexek deponációját mutatta ki egyedi és regionális változékonysággal. A nehézfémek ökotoxikológiai tulajdonságai standard biológiai effektusok leírását tették lehetővé

(pl. madár-embriókon a kadmium hatásait Ketresz *et al.* (1999) mutatták be).

Az inszekticidek hatóanyag koncentrációjának madártojásokban történő felhalmozódását is leírták. Az is felvetődött, hogy ezen mezőgazdasági kemikáliák befolyással vannak a madarak tojáshéj-vastagságára.

A jobban kutatott peszticidek maradványait (Beck & Stolting 1996) is kimutatták gémfélék szervezetében, tojásaiban és zsákmányállataiban is (Albanis *et al.* 1996). Afrikában vízi és szárazföldi madarak tojásaiban jelentős mennyiségű halogénezett szénhidrogén maradványokat találtak, hasonlóan az európai esetekhez (Wikteliuss & Edwards 1997). Dél-Texasban is detektálták, hogy a mezőgazdasági vegyszerek hatással vannak vadon élő madarak tojáshéjainak vastagságára (Marion 1976).

Magyarországon Várnagy & Füzesi (1979) és Várnagy (1991) az organofoszfátok hatásait vizsgálták - bemeztéses eljárással - a madár-embriók fejlődés-biológiai folyamataira. Jakab (1998) a természetben gyűjtött ragadozómadár tojások héj-vastagságán és a szaporulaton észlelt elváltozásokat, feltételezhetően mezőgazdasági vegyszerek hatására.

2. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki halogénezett szénhidrogén vegyületek ökotoxikológiai hatásainak tanulmányozását. Feladatunknak tekintettük, hogy olyan alapkísérletet állítsunk be, amellyel (a már meglévő nehézfém-ionok hatásainak detektálásához hasonlóan) standard biológiai hatásokat rögzítő adatbázist tudunk kialakítani egy igen stabil klórozott szénhidrogénre, a

klórbenzolra vonatkozóan. Fő szempontnak tekintettük vizsgálataink beállítása során, hogy olyan egyszerű eljárást alkalmazzunk, amellyel a halogénezett szénhidrogén hatást (standard vegyületünkkel a klórbenzollal) gyorsan, reprodukálhatóan nyomon követhetjük. Fontosnak tartottuk azt is, hogy vizsgálati mintáink olyanok legyenek, amelyeket majdan a természetben is könnyen begyűjthetünk (madarak tojáshéja). A madártojás az összes ökotoxikológiai paraméter (akut és szubakut toxicitás, tolerancia, mutagenitás, karcinogenitás, fertilitás, embriotoxicitás, teratogenitás, szenzibilizáció, helyi irritáció) tanulmányozására alkalmas (Moriarty 1983). Így jelen vizsgálataink tárgyául a madártojás héját választottuk. A kétnapos embriót tartalmazó házityúk tojások kezelésével nem fejlődés-biológiai megállapításokra, hanem a tojáshéj szerkezetének fizikai változásaira kívántunk adatokat nyerni.

3. Módszerek

Kísérleteinkben két napos embriókat (E2) tartalmazó, csoportonként tíz házityúk (*Gallus domesticus*) tojást használtunk fel. Ismert összetételű talajba (amely változó mennyiségű klórbenzolt tartalmazott) helyeztük a tojásokat (azonos módon, a vastagabb végükkel bemeztve magasságuk 1/3 részéig). A kezelés időtartama a hat vizsgálati csoportnál 14 nap volt. Az első csoportot a pozitív kontroll képezte, ahol a kezelés klórbenzol-mentes, egyebekben azonos minőségű talajban történt (n=10). A második csoportba a kezeltlen negatív kontrollok tartoztak (n=10). A harmadiktól a hatodik csoportot (n=10) különböző klórbenzol tartalmú talajokkal történt ke-

1. Táblázat. Talajminták klórbenzol tartalma a fúrás mélység szerint. Átlag $\pm$ SD (mg/kg).

Tab. 1. Chlorobenzene concentrations in the soil at different depths. Values are average (mg chlorobenzene/kg soil) $\pm$ one S.D.

Fúrás mélység / Depth	N	Σ klórbenzol / Chlorobenzenes	Σ (hexa-penta-tetra) klórbenzolok / Chlorobenzenes	Σ (tri-di-mono) klórbenzolok / Chlorobenzenes
1 0,1 m	9	88,3 $\pm$ 6,2	27,7 $\pm$ 2,94	60,6 $\pm$ 4,17
2 0,3 m	9	579,0 $\pm$ 16,8	99,6 $\pm$ 7,02	479,4 $\pm$ 12,61
3 0,5 m	9	21,5 $\pm$ 3,7	8,9 $\pm$ 2,11	2,6 $\pm$ 0,07
4 0,7 m	9	167,5 $\pm$ 10,3	130,6 $\pm$ 8,12	34,9 $\pm$ 3,11

zelések képezték (a klórbenzol tartalmát a GC-HSD módszerrel mértük és állítottuk be egy valóságos talajszennyezés, a hidasi hulladék-lerakó fúrás mintái alapján).

A tojáshéjak kezelést követő (t=14 nap) vizsgált paraméterei:

- a héj-vastagság (tapintó körzővel Salter (1963) szerint mérve),
- a tojáshéjak mikroszkópos szerkezete (Gill-haematoxilin festéssel),
- a tojáshéjak Ca^{2+} -tartalma (elektromos és kémiai dekalcinálással).

Eredményeinket a Ca^{2+} -tartalomra vonatkozóan a

$$\text{Ca}^{2+}\text{altindex} = \frac{\text{kezelt minta-negatív kontroll}}{\text{pozitív kontroll-negatív kontroll}}$$

képlettel, a tojáshéj vastagságát hasonló formulával analizáltuk.

Tojáshéj-vastagságtindex=

$$\frac{\text{kezelt minta-negatív kontroll}}{\text{pozitív kontroll-negatív kontroll}}$$

Az eredményeket variancia analízissel (ANOVA) elemeztük.

4. Eredmények

Az 1. Táblázatban a hidasi fúrás minták klórbenzol tartalmát tüntettük fel a fúrás mélység függvényében. A mérések átlageredményei szerint a talaj klórbenzol szennyezései mélységenként változó megoszlást mutatnak. Az ismert mennyiségű klórbenzolt tartalmazó talajba "merített" tojásokból származó héjak Ca^{2+} -tartalmának és vastagságának változásait tüntettük fel a 2. Táblázatban. Látható, hogy a kalcium-tartalmak erősen módosultak. A pozitív kontrollok (n=25) Ca^{2+} -tartalmának változása 3,21 $\pm$ 0,09, a negatív kontrolloknál (n=25) a Ca^{2+} -tartalom módosulás 0,11 $\pm$ 0,02 a tojáshéjakban. A tojáshéj-vastagság változásai is jelentősek.

2. Táblázat. Különböző klórbenzol dózisok hatása a házityúk-tojáshéj Ca^{2+} -tartalmának és vastagságának változásaira.

Tab. 2. Effects of different chlorobenzene concentrations on the Ca^{2+} content and thickness of hen eggs' shell.

Fúrás mélység / Depth	N	Ca^{2+} altindex	Tojáshéjvastagságtindex
1 0,1 m	140	4,32 $\pm$ 1,37*	2,7142 $\pm$ 0,78*
2 0,3 m	110	14,14 $\pm$ 1,67*	1,5714 $\pm$ 0,68*
3 0,5 m	110	2,25 $\pm$ 0,31*	2,1428 $\pm$ 0,39*
4 0,7 m	110	7,92 $\pm$ 0,87*	1,0000 $\pm$ 0,88*

* = P<0,01

5. Megvitatás

Talajszennyezések esetén a klórbenzol megoszlása nem homogén (Suter & Alder 1997). A nehéz klórbenzolok (hexa-, penta-, tetraklórbenzol) a talajban lassan lefelé mozogva a mélyebb rétegekbe jutnak (1. Táblázat). Az inszekticid vagy oldószer jellegű terhelésekkel a talajba (vízbe, levegőbe) kerülő klórbenzolok vízdékonysága rossz. Az alacsonyabban klórszubsztituált származékok illékonyasága jelentős. A talajbeli inhomogenitásuk oka elsősorban a nagyobb szennyező kristálygócok kialakulása (Novak & Christ 1997), ami a talaj adszorbtív képességének függvénye (Beck & Stolting 1996). Az erős perzisztencia eredményeként a klórbenzolok volumene igen hosszú ideig nem csökken a talajban, ugyanis az adszorbtív anyagok kristálygócokban tartalmazzák inhomogén eloszlásban ezen kemikáliákat. Amennyiben bomlanak, egy hexaklórbenzol molekula akár hat monoklórozott szénhidrogén származékot is eredményezhet, ami tovább növelheti a perzisztens származék koncentrációját a talajban. Ugyanakkor ezek illékony fázist is képezhetnek, ami kedvezhet a visszaalakulásnak (tetra-, penta-, hexaklórbenzollá), de a talajvíz és levegő szennyezéseknek is. Tehát a talajszennyezések folyamatos klórbenzol-szennyező forrásává válhatnak a víznek, a levegőnek. Ezáltal a talaj, a víz természetes életközösségeiben deponálódva azok bioregulációs folyamatait permanensen módosítják (Wismeth & Neuerburg 1997). Mindezek a valóságos ökotoxikológiai veszélyek indokolták a közvetlen és közvetett klórbenzol-hatások tanulmányozását.

A kontakt klórbenzollal való érintkezés

hatására a tojáshéjak elvékonyodtak, amit a Ca^{2+} -tartalmuk változása is kísért. A tojáshéjak vastagsága és Ca^{2+} -tartalmuk módosulása összefüggésbe hozható a klórbenzol kezelés dózisaival (2. Táblázat).

Azonban ha szorosan a klórbenzolnak a dózisfüggő tojáshéj-módosulást (Ca^{2+} tartalom, héjvastagság) eredményező hatásait elemezzük, nem találunk szigorú összefüggéseket. Ugyanis az 1. és 2. Táblázatok 2. számmal jelzett mintaoszlopai szerint a legmagasabb összes klórbenzoldózis nem a legintenzívebb tojáshéjvastagságot moduláló tényező. Viszont ha az 1. Táblázatot tovább vizsgáljuk, azt a megállapítást tehetjük, hogy a magasan klórszubsztituált klórbenzolok dózisainak növekedésével arányosan módosulnak a tojáshéjvastagságok. Ugyanakkor a kezelt tojáshéjak Ca^{2+} -tartalmának változása korrelációt mutat az összklórbenzol koncentrációjával. Ismert tény, hogy a tojáshéjak kalcium-tartalmát az embriók is felhasználják fejlődésük során. Esetünkben azonban az eltéréseket a negatív kontrollok mért adataival végzett korrekcióval vettük figyelembe (altindex számítások). A kezelt és kezeletlen tojások feltörése után organoleptikus vizsgálattal az embriók között lényeges eltérést nem észleltünk. (Mivel vizsgálatunk célja nem embriológiai tárgyú volt, ezért a tojáshéjakon észlelhető változásokra koncentráltunk.). A tojáshéjak ugyan vékonyabbak lettek, de sokkal ridegebbek, ezért nehéz volt feltörni őket. Valószínűsíthető, hogy a tojások kikelését az eredeti tojáshéj-szerkezet (Harrison 1975) megváltozása is akadályozhatja.

A tojáshéjak külső és belső felületén különféle elváltozások tapasztalhatók: szürke és sárga foltok, a héjhártya elváltozása, elválása és felpúposodása. A mik-

roszkópos szerkezet a héjak vékonyodását mutatja, a szivacsos és mamilláris rétegek összeesése folytán. Jól láthatók a héjszémölcsök szétesése a belső felületen. A kalcium-vesztésre utaló jelek a fentieken kívül a rétegek elválásával és elvékonyodásával jelentkeznek.

Köszönetnyilvánítás. A vizsgálatokat segítette az ETT/021221/97, a BVM Rt. és a Bionika Rt.

Irodalomlista

- Albanis, T. A., Hela, D., Papakostas, G. & V. Goutner. 1996. Concentration and bioaccumulation of organochlorine pesticide residues in herons and their prey in wetlands of Thermaikos Gulf, Macedonia, Greece. – *Sci. Total. Environ.* 182: 11-19.
- Beck, A. J. & H. Stolting. 1996. Leaching of recently applied and aged residues of the herbicides atrazine and isoprotosan through a large, structured clay soil core. – *Chemosphere* 33: 1297-1305.
- Elliott, J. E., Norstrom, R. J. & G. E. Smith. 1996. Patterns, trends, and toxicological significance of chlorinated hydrocarbon and mercury contaminants in bald eagle eggs from the Pacific coast of Canada, 1990-1994. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 354-367.
- Harrison, C. 1975. Nests, Eggs and Nestlings of European Birds with North Africa and the Middle East. – Collins, London.
- Jakab, B. 1998. A környezetszennyezés káros hatása a madárszaporulatra a tojáshéj vizsgálatok tükrében. – *Tenkes* 2: 40-47.
- Kertész, V., Hubik, I. & J. Kovács. 1999. The role of the eggshell in the transport of cadmium to the developing bird embryo. Pp. 49-55. In: Tomoska, L. & S. Vizi. (eds). Second Int. Conf. on Environ. Engin. – Univ. Veszprém, Hungary.
- Marion, W. R. 1976. Organochlorine pesticide residues in plain Chachalacas from South Texas, 1971-1972. – *Pestic. Monit. J.* 10: 84-86.
- Molnár, G., Soós, K., Kosznai, N., Juhász, A., Petri, A., Tóth, R., Molnár, J., Gáspár, L., Vetró, O. & M. Gálfi. 1999. The effects of organo-chlorines on eggshell thickness and reproduction. – 6th Meeting of the Central European Regional Section in Conjunction with the Annual Meeting of the Union of the Hungarian Toxicologists, Balatonföldvár.
- Moriarty, F. 1983. *Ecotoxicology*. – Academic Press, Harcourt Brace.
- Novak, P. J. & S. J. Christ. 1997. Kinetics of alachlor transformation and identification of metabolites under anaerobic conditions. – *Water Res.* 31: 3107-3115.
- Saller, K. 1963. *Lehrbuch der Anthropologie*. Band 1. 280-281. – Stuttgart, Germany.
- Soós, K., Valkusz, Zs., Vetró, O., Juhász, A., Petri, A., Molnár, Gy., Molnár, J. & M. Gálfi. 2000. Primary monolayer all cultures as model system for studying of environmental toxic agents: organo-chlorine compounds. – *Central European Journal of Public Health* 8: 35-36.
- Suter, J. J.-F. & A. C. Alder. 1997. Determination of hydrophilic and amphilic organic pollutants in Ha aquatic environment. – *Chemia* 51: 871-857.
- Várnagy, L. I. Füzesi. 1979. Fűrtojások permeabilitás vizsgálata metil-parathion 18WP és parathion 20WP alkalmazásával. – *Növényvédelem* 19: 385-388.
- Várnagy, L. 1991. Különböző növényvédő szerek hatása madármagzatokon. – *Doktori értekezés*, Keszthely.
- Wikteliuss, S. & C. A. Edwards. 1997. Organochlorine insecticide residues in African fauna: 1971-1995. – *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 151: 1-37.
- Wismeth, D. & W. Neuerburg. 1997. Grundwasserschutz durch ökologischen Landbau. – *Das Gas- und Wasserfach- Wasser, Abwasser* 138: 144-149.