

Különböző szemcseméretű cink-oxid hatása talajlakó ugróvillás és fonálféreg tesztorganizmokra*

KISS LOLA VIRÁG, HRÁCS KRISZTINA, NAGY PÉTER ISTVÁN és SERES ANIKÓ

Szent István Egyetem, Állattani és Állatökológiai Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.

E-mail: magicenne@hotmail.com

Összefoglalás. A nanotechnológia elterjedtté válása indokolja, hogy az így előállított anyagok környezeti és egészségügyi kockázatát megfelelőképpen vizsgáljuk. A nanoanyagok közé tartoznak azok az anyagok, amelyek legalább egy dimenzióban az 1–100 nm-es mérettartományba esnek, ami miatt minőségileg új tulajdonságokkal rendelkeznek, így más kockázattal is járhatnak, mint a nagyszemcsés megfelelőjük. Vizsgálatunkban a nagy szemcseméretű és a nanoméretű cink-oxid (ZnO) toxicitását vizsgáltuk két talajállaton, a *Folsomia candida* ugróvillás- és a *Panagrellus redivivus* fonálféregfajon. Mindkét faj esetében az állatok mortalitása volt az elvégzett tesztek végpontja, valamint az ugróvillás fajnál a ZnO reprodukcióra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. Kereskedelmi forgalomban kapható nagyszemcsés és egy nano mérettartományba sorolt (a gyártó szerint 50 nm részecskeátmérőnél kisebb) készítményt hasonlítottunk össze. Az ugróvillás tesztben a nagyszemcsés ZnO esetében már a legkisebb koncentrációban (400 mg/l) is szignifikáns mortalitás növekedést és reprodukció csökkenést tapasztaltunk. A két anyag hatása között marginálisan szignifikáns különbséget találtunk a reprodukció vizsgálata esetében ($F=3,1150$; $p<0,086$). Ebben a kísérletben a nagyszemcsés anyag bizonyult relatíve toxikusabbnak. A *P. redivivus* fonálféregfaj esetén – az előkísérletek adatai alapján – alacsonyabb koncentrációkkal dolgoztunk. Még a legalacsonyabb koncentráció (3,125 mg/l) is szignifikáns hatást gyakorolt a mortalitásra a kontrollcsoporthoz képest. Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy a két talajlakó tesztorganizmus közül a fonálféregfaj érzékenyebbnek bizonyult a nano ZnO-dal szemben, ami az eltérő érzékenységgel és a különböző tesztközeggel magyarázható. Kísérleteinkben, a két vizsgált talajlakó faj esetében nem találtunk a kisebb szemcseméretre köthető magasabb toxicitást a kereskedelmi forgalomban kapható két különböző szemcseméretű ZnO között.

Kulcsszavak: *Folsomia candida*, *Panagrellus redivivus*, nano cink-oxid, nanotechnológia

Bevezetés

A nanotechnológia az utóbbi években mindennapjaink részévé vált, a 21. század egyik leggyorsabban fejlődő iparágaként. A termékeit felhasználhatják a kozmetikai, a gyógyszer-, az elektronikai és az élelmiszeriparban is. A felhasználás során a méretcsökkenésből adódó megváltozott tulajdonságokat használják ki, ugyanakkor az ebből adódó lehetséges hátrányokkal és veszélyekkel sokkal kisebb mértékben foglalkoznak. A legtöbb nanoméretű anyagnak a környezeti kockázata még felderítetlen, ennek ellenére már több éve nagy

* Előadták a szerzők a Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztálya 1023. előadóján 2015. március 4-én.

mennyiségben használatban vannak és így ki is kerülhetnek a környezetbe. A nano méret-tartományban az anyagok fizikai, kémiai és mechanikai tulajdonságai lényegesen megváltoznak. A méret csökkenésével nő a fajlagos felület, viszont a tömeg nem változik (CATTANEO et al. 2009). A megnövekedett fajlagos felület és a reakcióképesség megkönnyítheti az anyagok biológiai elérhetőségét és megnövelheti a toxicitását. A nanoanyagok ökototoxicitására vonatkozóan kevés adatot találhatunk (KAHRU & DUBOURGUIER 2009). LOCKMAN et al. (2003) és OBERDÖRSTER (2004) leírták, hogy a nanorészecskék képesek átjutni a legerősebb biológiai membránokon is, mint például a vér-agy gáton is, és ezen keresztül a központi idegrendszerbe is bekerülhetnek. Számos nanoszemcsés anyagnál, főleg a fémoxidok esetében kimutatták a reaktív oxigéngyökök fokozott termelődését (PÁNDICS 2008).

A cink-oxid nanostruktúrát sokféleképpen alkalmazzák sokoldalúsága és kompatibilitása miatt. A nano ZnO iránti nagy érdeklődés a lehetséges alkalmazások sokféleségéből ered az elektronikában, a szerkezeti felépítésekben és a biológiai anyagoknál (KUCHIBHATLA et al. 2006). Ezek felül még használhatják környezeti kármentesítésre, termékek adalék-anyagaiként, élelmiszerekben (Zn tápanyagforrás), kozmetikai szerekben és naptejekben a kiváló UV abszorpciós és reflexiós tulajdonságai miatt (HONGBO et al. 2013). A nanoanyagok széles körű és bővülő előállításának és használatának köszönhetően egyre nő a környezetbe jutás lehetősége, ezáltal veszélyt jelenthetnek a talajszervezetekre (WAALLEWIJN-KOOL et al. 2013). A fémoxid nanoszerkezetek toxicitása legalább három különböző mechanizmusra vezethető vissza (BRUNNER et al. 2006). Először is a részecskék-ből a környezettel reagálva toxikus összetevők oldódhatnak ki, például a cink ion a ZnO-ból. Másrészt a részecskén lezajló felületi kölcsönhatások előidézhettek olyan toxikus összetevők keletkezését, mint például a kémiai gyökök, illetve a szabad oxigéngyökök. Harmadszor a részecskék vagy a felületük közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a szervezettel és meg is zavarhatják annak működését, például olyan módon, ahogy a nanorészecskék kölcsönhatásba léphetnek a membránokkal, illetve a DNS-szalba is beépülhetnek. Ez a három folyamat a nano ZnO-ra is igaz. A kioldódott Zn^{2+} ion bizonyítottan hozzájárul ezeknek a nanorészecskéknek a citotoxicitásához (HONGBO et al. 2013). A közeg kémhatása is fontos szerepet játszik a cink ionok kioldódásában (WAALLEWIJN-KOOL et al. 2013).

A ZnO és a nano ZnO toxicitását sok kísérletben hasonlították össze. WONG et al. (2010) öt tengeri élőlényen tesztelték a két anyagot. Kísérleteik során a nano ZnO (20 nm) nagyobb aggregátumokat képzett a tengervízben, mint a nagyszemcsés megfelelője, pedig magasabb a vízzoldhatósága: nano ZnO (3,7 mg/l), ZnO (1,6 mg/l). A vizsgálataikban a nano ZnO toxikusabbnak bizonyult az algafajokra, viszont relatíve kevésbé toxikusnak a rák- és halfajokra, mint a nagyszemcsés ZnO. HEINLAAN et al. (2008) és BLINOVA et al. (2010) kísérleteiben mind a nanoméretű, mind a nagyszemcsés cink erősen toxikus volt, a két anyag hatása között nem volt szignifikáns különbség. Hasonló eredménye lett XIONG et al. (2011) kísérleteinek zebradánio (*Danio rerio*) halfajon. A nagyszemcsés és nano szuszpenzióknak, valamint a cink-ion oldatnak hasonló toxikus hatása volt a trópusi eredetű házi-asított halfajra.

Az ugróvillások (Collembola) a hatlábúak (Hexapoda) egy ősi csoportja. A mezofaunához tartoznak, világszerte elterjedt állatok, csak a tengerek és óceánok nyíltvízi területein nem találhatók meg. Élhetnek a talaj felszínén, a talajban, a korhadó avarban, a fák kérge alatt és magukon a növényeken is. Az utóbbi ugyanúgy jellemző mind a száraz-

földi, mind a vízinövényekre is (DÁNYI & TRASER 2007). Fontos szerepet töltenek be a talaj életében, jelentősek a lebontásban, mint a fő lebontó mikrobapopulációk szabályozó szervezetei (GANGE 2000, SERES 2009). Emellett jelentősek lehetnek a mikorrhiza gombák terjesztésében (KLIRONOMOS 1999, SERES & BAKONYI 2002, SERES et al. 2003) és a talajfauna ragadozóinak táplálékbázisaként is (DÁNYI & TRASER 2007). A remediációs folyamatokban is részt vesznek és érzékenyek a talajszennyezés hatásaira (WAALEWIJN-KOOL et al. 2013).

Az ugróvillásokkal körülbelül négy évtizede dolgoznak ökotoxikológiai tesztek során (KROGH 2008, KISS & BAKONYI 1992). Leginkább erdei talajban élnek, részben kültakarón át is lélegeznek, ami miatt a talajgőzökre érzékenyek lehetnek. Megfelelő nedvességtartalmú, 20 °C-os környezetben 10–15 nap alatt kelnek ki, majd további 10–15 nap alatt válnak ivaréretté (GRUIZ et al. 2001). A nano ZnO toxikus hatását a *Folsomia candida* (WILLEM, 1902) fajra több kísérletben is igazolták már (KOOL et al. 2011, WAALEWIJN-KOOL et al. 2012, 2014).

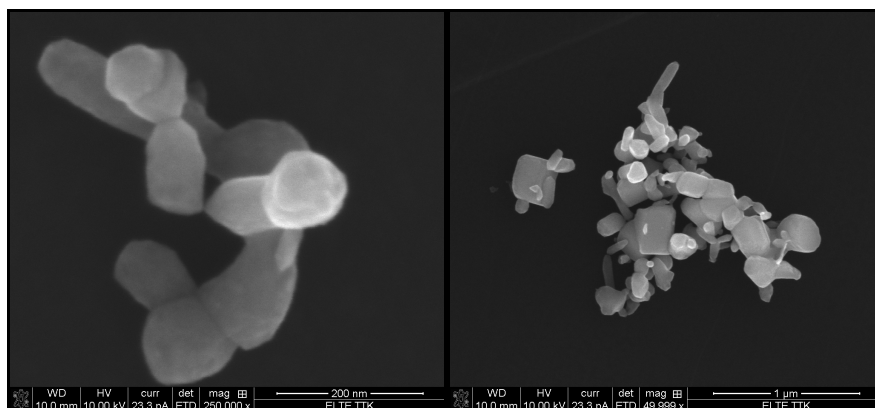
A fonálférgeket több mint három évtizede használják laboratóriumi tesztekben. Különböző fajokat vontak be a vizsgálatokba a toxicitás kimutatására, vízben, táptalajokon és talajban tesztelve. Nagyrészt szabadon élő, baktériumokkal táplálkozó fajokat használnak tesztállatként. Az ökotoxikológiai és genetikai vizsgálatokban főképp a *Panagrellus* fajok és a *Caenorhabditis elegans* (MAUPAS, 1900) az elterjedt modellállatok (HÖSS & WILLIAMS 2009). Mostanában több standardizált módszer is született a szennyvíz, az üledék és a talaj tesztelésére a fonálférgek felhasználásával. Előnyük, hogy érzékenyen és más talajállatoknál rövidebb idő alatt reagálnak a különböző szennyezőanyagokra (HÖSS & WILLIAMS 2009). WANG et al. (2009) és KHARE et al. (2011) kísérleteiben erősen toxikusnak bizonyult a nano ZnO a *C. elegans* fajra. Mindkét vizsgálatnál azt állapították meg, hogy a ZnO részecskékből kioldódó cink ion játszott szerepet a toxikus hatás kiváltásában.

Mindezek alapján vizsgálati kérdéseink a következők voltak: (i) Milyen hatása van a két különböző szemcseméretű ZnO-nak a *F. candida* ugróvillásfaj mortalitására és reprodukciójára? (ii) Milyen hatása van a két különböző szemcseméretű ZnO-nak a *P. redivivus* fonálféregfaj mortalitására? (iii) Befolyásolja-e a szemcseméret a toxicitást?

Anyag és módszer

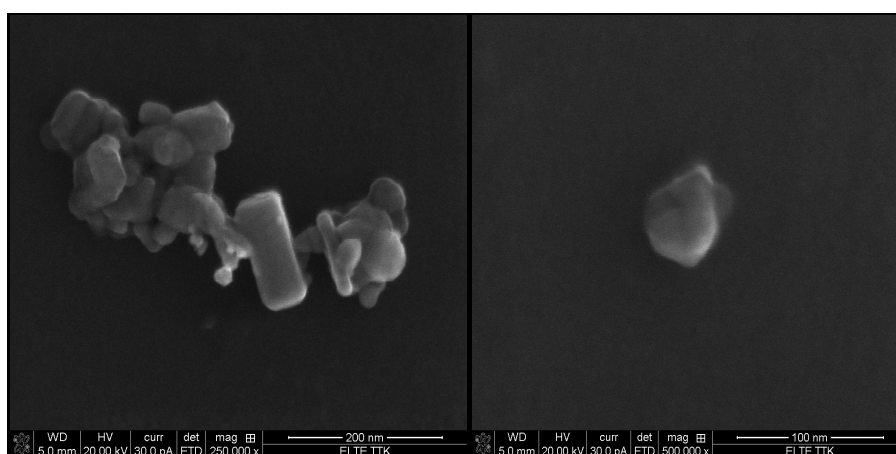
ZnO nano és nagyszemcsés tesztelt anyagok

A Sigma-Aldrich cég által előállított nagyszemcsés ZnO-ot (1–2. ábra) és ugyanennek a cégnek a gyártó adatai alapján 50 nm-nél kisebb részecskéket tartalmazó ZnO-ját (3–4. ábra) hasonlítottuk össze. SÁVOLY ZOLTÁN megvizsgálta a nano és bulk ZnO szemcseméret eloszlását pásztázó elektronmikroszkóp segítségével. A vizsgálat eredményei jelentősen eltértek a gyártó által megadott szemcsemérettől. A nano ZnO esetén az anyag nagyjából két mérettartományba osztható. Az anyag egy része 100–200 nm közötti, míg a másik 300–500 nm közötti, tehát ezek alapján a Sigma-Aldrich cég nano ZnO-ja már nagyszemcsésnek minősül. Ennek ellenére, a félreértések elkerülése végett, a továbbiakban is nano ZnO néven említjük ezt az anyagot, hiszen bár a nanoanyagokra vonatkozó definíciónak az általunk vizsgált körülmények között nem felelt meg, azért jóval kisebb szemcseméretű volt.



1–2. ábra. Sigma-Aldrich nagyszemcsés ZnO (Sávoly 2013)

Figs 1-2. Sigma-Aldrich bulk ZnO (Sávoly 2013)



3–4. ábra. Sigma-Aldrich 50> nano ZnO (Sávoly 2013)

Figs 3-4. Sigma-Aldrich 50> nano ZnO (Sávoly 2013)

***Folsomia candida* tesztfajjal végzett teszt**

A kísérlethez a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszékének tenyésztéből származó adult *Folsomia candida* (WILLEM, 1902) egyedeket használtunk. A tenyészeteket gipsz és orvosi szén keverékéből készült közegen tartottuk termosztátban 20 ± 1 °C-on, és élesztővel etettük az állatokat. A kísérletben a Sigma-Aldrich cég által gyártott nano ZnO-ot és a nagyszemcse méretű ZnO-t hasonlítottuk össze. A teszt végrehajtását az OECD 232 szabvány alapján végeztük, a szabványban meghatározott összetételű talajba helyeztük a kísérleti anyagot és az állatokat is. Edényenként 26 g talajt mértünk ki és ehhez kiszámoltuk, hogy mennyi kísérleti anyag szükséges a megfelelő koncentrációkhoz, majd a kimért

anyagot a talaj kívánt víztartalma alapján meghatározott vízmennyiséghez adtuk, és ezzel nedvesítettük a talajt. Így 6 ml desztillált vizet adtunk a kontroll edények esetében, és 6 ml desztillált vízben elkevert fém-oxidot a kezelt edények esetében. Az alkalmazott névleges teljes koncentrációk a következők voltak: 400 mg/l, 800 mg/l, 1600 mg/l, 3200 mg/l és 6400 mg/l (92 mg/kg, 185 mg/kg, 369 mg/kg, 738 mg/kg, 1477 mg/kg). Minden kezelést 4 ismétlésben állítottunk be. A szuszpenziókat felhasználás előtt ultrahangos szonikátorral homogenizáltuk 20 percig (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany, 37 kHz, 560 W). Előzetesen szinkronizált életkorú, 10–12 napos *F. candida* egyedeket használtunk, minden edénybe tíz állat került. Az állatokat a kísérlet elején egyszer etettük élesztővel. Az állatokat termosztátba (TS606-CZ/4-WAR) helyeztük 20 ± 1 °C-ra. A négy hét lejárta után a leolvasásnál csapvízzel töltöttük meg az edényeket, majd tintával színeztük be, hogy jól láthatóak legyenek az állatok. Ezek után leszámoltuk a túlélő adult egyedeket és a szaporulatot.

Panagrellus redivivus tesztfajjal végzett teszt

Akut mortalitási tesztekét végeztünk a *Panagrellus redivivus* (LINNÉ, 1767) szabadon élő, bakterivor táplálkozású fonálféregfaj kifejlett nőtény egyedein. A törzstenyészetet laboratóriumban, zabpelyhes táptalajon, sötétben, 20 ± 1 °C-os termosztátban (TS606 CZ/4-WAR) tartott példányok alkották. Nagy tisztaságú Mili-Q vizes közegben végeztük a tesztet, végpontja a mortalitás volt. Mivel a teszt nem szabványosított ökotoxikológiai teszt, az érvényességét úgy határoztuk meg, hogy a kontroll csoportban a maximális elhullás nem lehet több 20%-nál. Ennél a kísérletnél a Sigma-Aldrich cég által gyártott nano ZnO-ot és a nagy szemcseméretű ZnO-t használtuk. A koncentrációkat az előkísérletek alapján állítottuk be. Öt koncentrációt készítettünk: 50 mg/l, 25 mg/l, 12,5 mg/l, 6,25 mg/l és 3,15 mg/l. Minden koncentrációt nyolc ismétlésben állítottunk be. Az elkészült szuszpenziókat 20 percre ultrahangos szonikátorba helyeztük (Elmasonic S40 device, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Németország, 37 kHz, 560 W). A teszteket 96 lyukú mikrotitráló lemezekben (Bioster S.p.A., Olaszország) végeztük, ismétlésekként 5 kifejlett nőtényt használtunk. A mikrotitráló lemezeket termosztátba helyeztük 20 ± 1 °C hőmérsékletre. A 24 órás expozíciós idő elteltével megszámoltuk az elhullott egyedeket transzmissziós sztereomikroszkóp alatt (Olympus SZH 10).

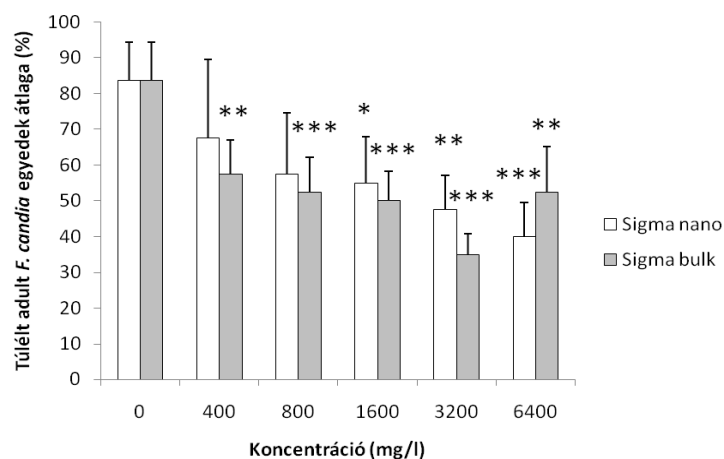
Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisnél az R programot használtuk (R CORE TEAM 2013), melynek segítségével ANOVA-t és *post hoc* tesztként Dunnett tesztet végeztünk. Függő változóként az elhullott egyedek illetve a született utódok száma szerepelt, míg magyarázó változóink a szemcseméret és a koncentrációk voltak.

Eredmények

A *Folsomia candida* fajjal végzett kísérlet eredményei

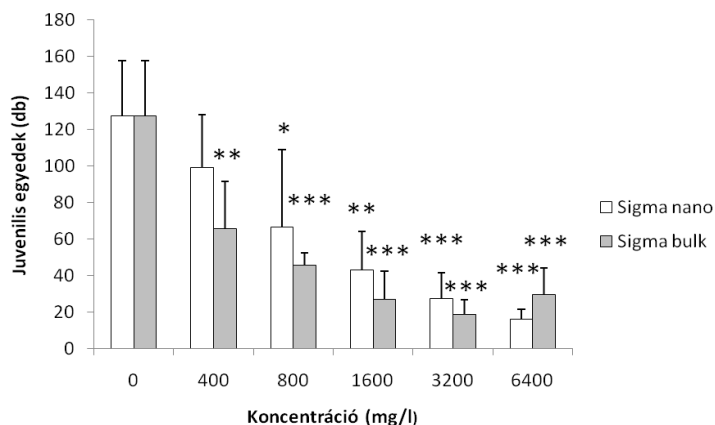
A talajközegben végzett főteszt megfelelt az érvényességi feltételeknek: Az adultak mortalitásának átlaga: 16,25%, a juvenilis egyedek számának átlaga: 127 db, a juvenilisek számának variációs koefficiense: 23,63% volt.



5. ábra. Sigma-Aldrich cég által gyártott nagyszemcsés és nanoszemcsés anyag hatása a *Folsomia candida* egyedek túlélésére (négy ismétlés átlaga és szórása). Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fig. 5. Sigma-Aldrich's bulk and nano ZnO effect on mortality of *Folsomia candida* (mean \pm SD). Significance levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

A *F. candida* adult egyedek mortalitására (5. ábra) és a reprodukció mértékére (6. ábra) a két anyag, a nagyszemcsés ($F=16,4$, $p < 0,001$) és a nanoméretű ZnO ($F=7,45$, $p < 0,001$) egyaránt szignifikáns hatással volt. Ezt a Dunnett-próba is igazolta. A két anyag hatása között marginálisan szignifikáns különbséget találtunk a juvenilisek esetében ($F=3,11$; $p < 0,086$). A nagyszemcsés anyag bizonyult relatíve toxikusabbnak.

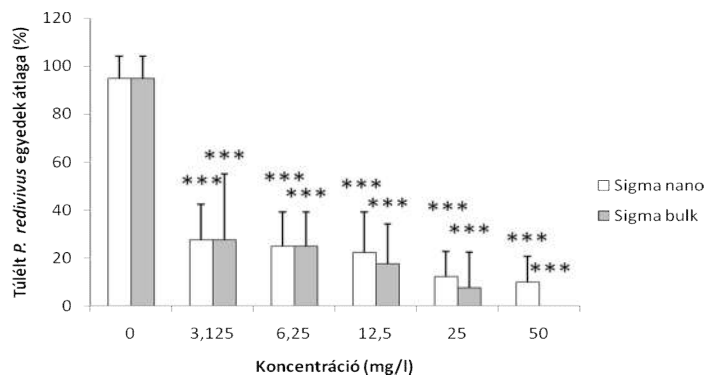


6. ábra. Sigma-Aldrich cég által gyártott nagyszemcsés és nanoszemcsés anyag hatása a *Folsomia candida* faj szaporodására (négy ismétlés átlaga és szórása). Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fig. 6. Sigma-Aldrich's bulk and nano ZnO effect on reproduction of *Folsomia candida* (mean and \pm SD). Significance levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

***A Panagrellus redivivus* fajjal végzett kísérlet eredményei**

A *P. redivivus*-ra mind a nanoszemcsés ($F=41,31$, $p < 0,001$), mind a nagyszemcsés anyag ($F=47,59$, $p < 0,001$) szignifikáns toxikus hatást mutatott a kontrollcsoporthoz képest (7. ábra).



7. ábra. Sigma-Aldrich cég által gyártott nagyszemcsés és nanoszemcsés anyag hatása a *Panagrellus redivivus* egyedek túlélésére (nyolc ismétlés átlaga és szórása). Szignifikancia szintek jelölései: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fig. 7. Sigma-Aldrich's bulk and nano ZnO effect on mortality of *Panagrellus redivivus* (mean \pm SD). Significance levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Értékelés

Kísérletünkben két talajlakó élőlény érzékenységét vizsgáltuk nagyszemcsés és nano ZnO-ra. KOOL et al. (2011) végzett teszteket a *F. candida* fajjal, vizsgálataikban a nano ZnO toxikusnak bizonyult az ugróvillásokra, viszont véleményük szerint nem a ZnO nanorészecskének, hanem a kioldódott cink ionoknak volt toxikus hatása. Mortalitás az általuk elvégzett kísérletben 6400 mg/kg alatti koncentrációknál nem jelentkezett. A mi *F. candida* fajjal végzett tesztünkben a nano ZnO-nak már 1600 mg/l-től (369 mg/kg) szignifikáns hatása volt a mortalitásra. WAALEWIJN-KOOL et al. (2012) is ugróvillásokkal kísérletezett talajban és talajszuszpenzióban. A különböző szemcseméretű ZnO-nak reprodukciót csökkentő hatásai voltak. A szemcseméret hatása között szignifikáns különbséget nem tapasztaltak, és a mortalitást és a reprodukciót a különböző közegek sem befolyásolták statisztikailag igazolhatóan. Ezekkel a kísérletekkel ellentétben az általunk végzett tesztben a mortalitásra is szignifikáns hatása volt mindkét anyagnak. A gyártó által forgalmazott kétféle ZnO közül a nagyszemcsés anyagnak volt marginálisan toxikusabb hatása a *F. candida* reprodukciójára. A korábbi vizsgálatoktól eltérő eredmények okai lehetnek a módszerbeli különbségek, a különböző kísérleti anyagok használata (más gyártótól, más szemcseméret nagyságú, a bevonat megléte vagy hiánya) és a *F. candida* törzsek laboratóriumonként változó érzékenysége (KROGH 2009).

IZSÁK (2013) dolgozatában és FOUNTAIN & HOPKIN (2001) vizsgálataiban, az OECD 232-es szabvány módosított változatát használták, tehát talajközeg helyett gipszen végezték az ugróvillás-mortalitás és reprodukciótesztet. FOUNTAIN & HOPKIN (2001) úgy találta, hogy ebben a tesztben a ZnO-nak kevésbé toxikus a hatása, mint a talajközegben végzett kísérletben. IZSÁK (2013) tesztjeiben a nano ZnO-nak nem volt hatása a mortalitásra, a reprodukciót viszont szignifikánsan csökkentette (koncentrációk: 200 mg/kg, 1600 mg/kg, 6400 mg/kg). Koncentrációfüggést nem tapasztalt.

A *P. redivivus* fonálféregfajjal végzett tesztben is szignifikáns mortalitást tapasztaltunk. Ehhez az eredményhez hasonlót közölt WILK (2014) a diplomadolgozatában. Ebben a munkában is a Sigma-Aldrich cég nagyszemcsés és nano ZnO-ját tesztelte a *P. redivivus* fajon, és a vizsgálatai alapján a nagyszemcsés anyag volt toxikusabb.

A két vizsgált faj közül a *P. redivivus* bizonyult érzékenyebbnek mind a nagyszemcsés, mind a nano ZnO-ra. Ez azzal is magyarázható, hogy a teszteket vizes közegben végeztük és nem volt hozzáadott szerves anyag a rendszerben. WAALEWIJN-KOOL (2014) kísérlete alapján kiderül, hogy a nano ZnO toxicitását befolyásolja a szerves anyag jelenléte, de főképp a talaj kémhatása. Kísérleteinkben, a két vizsgált talajlakó faj esetében nem találtunk a kisebb szemcsemérethez köthető magasabb toxicitást a kereskedelmi forgalomban kapható két különböző szemcseméretű ZnO között. Az anyagok közötti toxicitásbeli különbség magyarázatára további vizsgálatok elvégzése szükséges.

Köszönetnyilvánítás. Szerzők köszönetüket fejezik ki dr. SÁVOLY ZOLTÁNNAK a nanoanyagok karakterizálásának elvégzéséért. A kísérlet anyagi háttérét az OTKA K 81401 és a KTIA-AIK-12-1 pályázatok, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma által a SZIE MKK számára biztosított Kutató Kari Kiválósági Támogatás – 8526-5/2014/TUDPOL biztosította.

Irodalomjegyzék

- BLINOVA, I., IVASK, A., HEINLAAN, M., MORTIMER, M. & KAHRU, A. (2010): Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution* 158: 41–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.017>
- BRUNNER, T. J., WICK, P., MANSER, P., SPOHN, P., GRASS, R. N., LIMBACH, L. K., BRUININK, A. & STARK, W. J. (2006): In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology* 40: 4374–4381. <http://dx.doi.org/10.1021/es052069i>
- CATTANEO, A. G., GORNATI, R., CHIRIVA-INTERNATI, M. & BERNARDINI, G. (2009): Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal* 6: 78–97.
- DÁNYI L. & TRASER GY. (2007): Magyarország ugróvillásai. In: FORRÓ L. (szerk.): *A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása*. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, pp. 21–28.
- FOUNTAIN, M. T. & HOPKIN, S. P. (2001): Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a metal exposure test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48: 275–286. <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.2000.2007>
- GANGE, A. C. (2000): Arbuscular mycorrhizal fungi, Collembola and plant growth. *Trends in Ecology & Evolution* 15(9): 369–372. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01940-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01940-6)
- GRUIZ K., HORVÁTH B. & MOLNÁR M. (2001): *Környezettoxikológia, vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára*. Műegyetem Kiadó, Budapest, 158 pp.
- HEINLAAN, M., IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIER, H. C. & KAHRU, A. (2008): Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71: 1308–1316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>
- HONGBO, M., WILLIAMS, P. L. & DIAMOND, S. A. (2013): Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environmental Pollution* 172: 76–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.011>
- HÖSS, S. & WILLIAMS, P. L. (2009): Ecotoxicity testing with nematodes. In: WILSON, M.A. & KAKOULI-DUARTE, T. (eds): *Nematodes as Environmental Indicators*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA, pp. 208–224. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845933852.0208>
- IZSÁK B. (2013): *Különböző szemcseméretű ZnO hatásának vizsgálata Folsomia candida fajon (Collembola)*. Diploma dolgozat, Szent István Egyetem Mezőgazdasági- és Környezettudományi kar, Állattani és Állatökológiai Tanszék, Gödöllő, 56 pp.
- KAHRU, A. & DUBOURGUIER, H. (2009): From ecotoxicology to nano ecotoxicology. *Toxicology* 269: 105–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>
- KHARE, P., SONANE, M., PANDEY, R., ALI, S., GUPTA, K. C. & SATISH, A. (2011): Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 7(1): 116–117. <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2011.1229>
- KISS I., BAKONYI G. (1992): Guideline for testing the effects of pesticides on *Folsomia candida* Willem (Collembola): laboratory tests. In: Hassan S. A. (ed.): *Guidelines for Testing the Effects of Pesticides on Beneficial Organisms: Description of Test Methods*. IOBC/WPRS Bulletin XV:131–138.
- KLIRONOMOS, J. N. & MOUTOGLIS, P. (1999): Colonization of nonmycorrhizal plants by neighbours as influenced by the collembolan, *Folsomia candida*. *Biology and Fertility of Soils* 29: 277–281. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050553>

- KOOL, P. L., ORTIZ, M. D. & VAN GESTEL, C. A. M. (2011): Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution* 159(10): 2713–2719. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050553>
- KROGH, P. H. (2009): Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Miljøstyrelsen. Environmental Project. Miljøprojekt, 1256. számú kutatási jelentés, 66 pp.
- KUCHIBHATLA, S. V. N. T., KARAKOTI, A. S., BERA, D. & SEAL, S. (2006): One dimensional nanostructured materials. *Progress in Materials Science* 52(5): 699–913. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2006.08.001>
- LOCKMAN, P., OYEWUMI, M., KOZAIARA, J., RÖDER, K. E., MUMPER, R. J. & ALLEN, D. D. (2003): Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 93: 271–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.08.006>
- OBERDÖRSTER, E. (2004): Manufactured nanomaterials (fullerens, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile large mouth bass. *Environmental Health Perspectives* 112: 1058–1062. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7021>
- PÁNDICS T. (2008): A nanorészecskék környezetegészségügyi hatásainak elemzése. *Egészségtudomány* 52(3): 5–20.
- R CORE TEAM (2013): <http://www.r-project.org/>
- SÁVOLY Z., NAGY P., VARGA G., HAVANCSÁK K., HRÁCS K. & ZÁRAY GY. (2013): A novel method for investigation of uptake and distribution of polluting microelements and nanoparticles in soil-inhabiting nematodes. *Microchemical Journal* 110: 558–567. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.07.007>
- SERES A. & BAKONYI G. (2002): A talajlakó állatok és az endomikorrhiza-gombák közötti kapcsolatok szerepe a növények tápanyagellátásában. *Agrokémia és Talajtan* 51(3–4): 535–546. <http://dx.doi.org/10.1556/Agrokem.51.2002.3-4.17>
- SERES A. (2009): *A mikorrhiza-ugróvillás (Collembola) kapcsolatok szerepe a kukorica tápanyagfelvételében*. PhD-disszertáció, Szent István Egyetem, Gödöllő, 97 pp.
- SERES A., BAKONYI G. & POSTA K. (2003): Ugróvillások (Collembola) szerepe a *Glomus mosseae* (Zygomycetes) arbuskuláris mikorrhiza gomba terjesztésében. *Állattani Közlemények* 88(1): 61–71.
- WAALEWIJN-KOOL, P. L., DIEZORTIZ, M. & VAN GESTEL, C. A. M. (2012): Effect of different spiking procedures on the distribution and toxicity of ZnO nanoparticles in soil. *Ecotoxicology* 21:1797–1804. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-012-0914-3>
- WAALEWIJN-KOOL, P. L., DIEZORTIZ, M., VAN STRAAL, N. M. & VAN GESTEL, C. A. M. (2013): Sorption, dissolution and pH determine the long-term equilibration and toxicity of coated and uncoated ZnO nanoparticles in soil. *Environmental Pollution* 178: 59–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.003>
- WAALEWIJN-KOOL, P. L., RUPP, S., LOFTS, S., SVENDENSEN, C. & VAN GESTEL, C. A. (2014): Effect of soil organic matter content and pH on the toxicity of ZnO nanoparticles to *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 9–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.031>
- WANG, H., WICK, R. L. & XING, B. (2009): Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* 157(4): 1171–1177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.004>
- WILK T. (2014): *Nano méretű és nagyszemcsés cink-oxid ökotoxikológiai hatásvizsgálata* Panagrellus redivivus fonálférgen. Diploma dolgozat, Szent István Egyetem Mezőgazdasági- és Környezetudományi kar, Állattani és Állatökológiai Tanszék, Gödöllő, 48 pp.

- WONG, S. W. Y., LEUNG, P. T. Y., DJURIŠIĆ, A. B. & LEUNG, K. M. Y. (2010): Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 609–618. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3249-z>
- XIONG, D., FANG, T., YU, L., SIMA, X. & ZHU, W. (2011): Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment* 409: 1444–1452. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>

The toxic effects of different particle sized zinc oxide on terrestrial springtail and nematode test organisms

LOLA VIRÁG KISS, KRISZTINA HRÁCS, PÉTER ISTVÁN NAGY & ANIKÓ SERES

Szent István University, Department of Zoology and Animal Ecology, Páter K. u. 1, H-2100 Gödöllő, E-mail: magicenne@hotmail.com

ÁLLATTANI KÖZLEMÉNYEK (2015) 100(1–2): 77–88.

Abstract. The spread of nanotechnology justifies the proper analysis of the hazard of materials, including environmental and health risks attributed to this emerging technology. Nanomaterials can be classified as materials with particles being in the size range of 1–100 nm at least in one dimension. These substances have new „nano-relevant” characteristics, so they pose other risks than their bulk equivalents. During our study, we analysed the toxicity of bulk and nano zinc-oxid (ZnO) forms and their effects on stress responses of two soil organisms, *Folsomia candida* (Collembola) and *Panagrellus redivivus* (Nematoda). In the case of the nematode species, only mortality tests were carried out. The substrate in the collembola test was soil and in the nematode test distilled water. Two types of materials were tested, a commercially available bulk ZnO and another ZnO that contains smaller particles than 50 nm, as stated by the manufacturer. During the test with *F. candida* in artificial soil (OECD 232), even the lowest concentration (400 mg/l) caused significantly higher mortality and lower reproduction compared to the control. The bulk material proved to be marginally more toxic ($F=3.11$; $p<0,08561$). In the case of *P. redivivus*, a free living, bacterivor nematode, lower concentrations were chosen, based on results from preliminary tests. Even in the lowest concentration (3,125 mg/l) mortality was significantly higher than in the control group. Based on our experimental results, we can conclude that the nano ZnO proved more toxic on nematodes, probably as a consequence of their higher sensitivity and due to the different media.

Keywords: *Folsomia candida*, *Panagrellus redivivus*, nanoparticles (NP), ZnO, nanotechnology