



Reprodukció-gátlás vizuális értékelése ökotoxikológiai tesztekben

Kováts¹ N., Császár² G., Borbély³ G., Refaey¹, M.

¹Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Környezetmérnöki és Kémiai Technológia Intézeti Tanszék, 8200 Veszprém Egyetem u. 10

²Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Képfeldolgozás és Neuroszámítógépek Tanszék, 8200 Veszprém Egyetem u. 10

³Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, 8200 Veszprém Egyetem u. 10

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ökotoxikológiai gyakorlatban elterjedten alkalmazott, Magyarországon jelenleg előkészületben levő szabványként ismert teszt a Lemna minor (kis békalencse) reprodukció gátlásán alapszik (ISO/FDIS 20079: Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (Lemna minor) - Duckweed growth inhibition test). A reprodukció mérésére a rendelkezésre álló protokollok a következő mérhető paramétereket említik: levélkészám, száraz ill. nedves tömeg, valamint felület. A Pannon Egyetem Képfeldolgozás és Neuroszámítógépek Tanszékén kifejlesztett Duckweed Detector a levélfelület automatizált mérését végzi el, megkülönböztetve az élő (egészséges), ill. az elpusztult (valamilyen toxikus hatás miatt klorózist/nekrózist szenvedett) leveleket. (Kulcsszavak: Lemna minor, reprodukció-gátlás, felületmérés, vizuális értékelés)

ABSTRACT

Visual assessment of growth inhibition in ecotoxicological tests

N. ¹Kováts, G. ²Császár, G. ³Borbély, M. ¹Refaey

¹Univ. of Pannonia, Faculty of Engineering, Dept. of Environmental Engineering and Chemical Technology, H-8200 Veszprém, P.O.Box 158

²Univ. of Pannonia, Faculty of Information Technology, Dept. of Image Processing and Neurocomputing
8200 Veszprém P.O.Box 158, Hungary

³Univ. of Pannonia, Faculty of Information Technology, Research Institute of Chemical and Process Engineering
8200 Veszprém P.O.Box 158, Hungary

The Lemna minor growth inhibition test is widely used in ecotoxicology, the standard is to be introduced in Hungary (ISO/FDIS 20079: Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (Lemna minor) - Duckweed growth inhibition test. According to available test protocols, growth can be assessed on the basis of frond number, wet weight and total frond surface. The Duckweed Detector developed at the Department of Image Processing and Neurocomputing of the University of Pannonia carries out surface measurements automatically, distinguishing between healthy and dead (chlorotic/necrotic) fronds.

(Keywords: Lemna minor, growth inhibition, surface measurement, visual assessment)

BEVEZETÉS

Az ökotoxikológiai gyakorlatban elterjedten alkalmazott, Magyarországon jelenleg előkészületben levő szabványként ismert teszt a Lemna minor (kis békalencse) reprodukció gátlásán alapszik (ISO/FDIS 20079: Water quality - Determination of the

toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test).

A kis békalencse gyakorlatilag az egész Földön elterjedt, a víz felszínén úszó edényes növény. Könnyű begyűjteni, és könnyű a laboratóriumban tartani. Ennek eredményeként a békalencsével végzett toxicitás-beclsés gyakorlatilag a legolcsóbban elvégezhető ökotoxikológiai teszt. Nemcsak ebben rejlik a jelentősége: mivel az ökotoxikológiában nagyon kevés olyan tesztszervezetet alkalmazunk, amely a magasabbrendű növények közé tartozna, a békalencse egy fontos taxonómiai csoportot reprezentál (Suter, 1993).

Jellemzője, hogy ivartalanul szaporodik: a növény új leveleket hoz, amelyeknek saját gyökere fejlődik (1. ábra). Az új levelek előbb-utóbb leválnak az anyanövényről és önálló egyedként kezdenek el funkcionálni. A szaporodási sebesség általában nagy, néhány *Lemna* faj leveleinek duplázódási ideje 0,35-2,8 nap között van (Wang, 1990).

1. ábra

Új levélke képződése

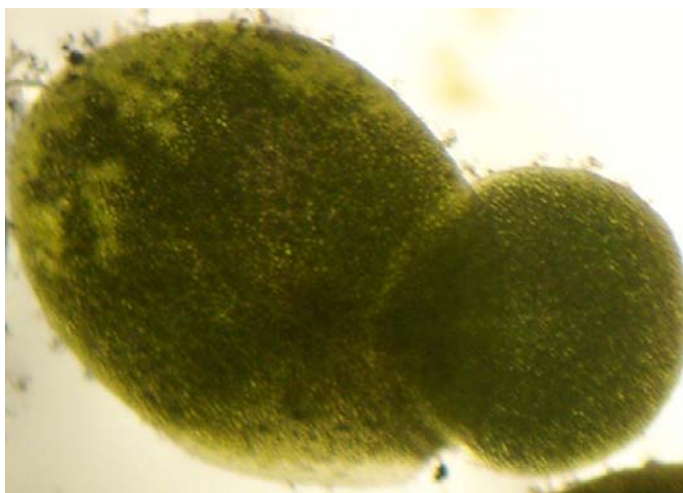


Figure 1: Development of a new frond

A teszt során a növénynek épp ezt a jellemzőjét használjuk ki: azt mérjük, hogy valamilyen feltehetőleg toxikus közegben a kontrollhoz képest hogyan csökken a növekedés mértéke, azaz a vizsgált komponens milyen gátló hatással bír a növekedésre. Az alkalmazott expozíciós idő hét nap.

A növekedés mértékének számszerűsítésére a leggyakoribb mért paraméter a levélkészám, de gyakran meghatározzák a biomasszára, levél-átmérőre, gyökérhosszra és a klorofill-a-ra gyakorolt hatásokat is. A kalkulált paraméterek az ökotoxikológiai gyakorlatnak megfelelően EC₅₀, NOEC vagy LOEC formájában adhatók meg. (EC₅₀: ún. féllétális koncentráció, amely 50%-os hatást, jelen esetben 50%-os növekedésgátlást vált ki. NOEC: No Observed Effect Concentration, azaz az a koncentráció, amely még nem vált ki észlelhető hatást. LOEC: Lowest Observed Effect Concentration, azaz az a legkisebb koncentráció, ahol már megfigyelhető/mérhető hatás lép fel.)

Az OECD szabvány (OECD, 2002), ill. a jelenleg hazánkban előkészületben levő ISO szabvány (ISO/FDIS 20079) a következő mérhető paramétereket említi: levélkeszám, száraz ill. nedves tömeg, valamint felület. A száraz tömeg mérése során sérülhetnek a levélkék. A nedves tömeg mérése azért nehézkes, mert nagyfokú mérési hibát rejt magában, hiszen a víz tömegét is hozzászámítjuk a levélkék tömegéhez. A levélkeszám megszámlálása bár nem igényel külön képzettséget, de itt is jelentkezhet egyfajta mérési hiba: olykor nem is olyan egyszerű eldönteni, pontosan mit is tekintünk új levélkének, hiszen egy frissen képződő levélke kezdetben csak egy dudorként jelenik meg. Ezek a mérési hibák az eredmények esetleges pontatlansága mellett azt is eredményezik, hogy az ökotoxikológiai teszteknek egy fontos minőségbiztosítási komponense, nevezetesen a reprodukálhatóság (USEPA, 1997), nem teljesül. A nedves súly mérését ill. a képződött új levélkék számának értékelését ugyanazon személy kell hogy végezze, kiküszöbölve az eltérő manuális technikából vagy rutinból eredő eltéréseket. (A nedves súly mérése tapasztalatunk szerint ráadásul azért sem megfelelő technika, mert esetenként sérülhetnek maguk a tesztorganizmusok, vagy fertőzést vihetünk a tesztpopulációba.)

Harmadik lehetőség a felület mérése, erre a szabvány “manuális” valamint digitális technikákat javasol.

Elsődleges célunk olyan vizuális módszer kidolgozása volt, amelynek segítségével a reprodukció mérése könnyen kivitelezhető, automatizálható és a mérési hibák kiküszöbölhetőek. Kiindulási pontunk a felület volt, azaz a békalencse összfelületének a mérése. Ehhez fontos tudnunk, hogy az egyes levélkék mindig a víz felszínén helyezkednek el, nem fordulnak el, és egymást nem takarják.

A NÖVEKEDÉS-GÁTLÁS SZOFTVERREL SEGÍTETT VIZUÁLIS ÉRTÉKELÉSE

Ismertek olyan képelemző szoftverek, amelyek a növekedés-gátlást a felület mérésén keresztül számítják és így a *Lemna* teszt szabvány szerinti kiértékelésére alkalmasak (Eberius, 2001). A Pannon Egyetem Képfeldolgozás és Neuroszámítógépek Tanszékén került kifejlesztésre a Duckweed Detector (DwD) v0.1/v.02 szoftver, amely a felület vizuális becslését végzi. A program megadja mind az élő, mind a halott levélkék által fedett terület teljes vizsgálati területhez viszonyított százalékos arányát (2. ábra).

Az eljárás algoritmusa a következő:

1. A békalencse-tenyészetet alulról fehér fényvel megvilágítjuk, majd felülről lefényképezzük.
2. A képet színekre bontjuk. A kiértékeléshez célszerűen a piros vagy a kék sávot vizsgáljuk. (A háttérfény fehér, tehát tartalmaz kék, zöld, és vörös komponenst is. Ez azért fontos, mert a kamera CCD-je ezt a három sávot méri a színes kép előállításához. Ahol a fény (majdnem) akadály nélkül jut a kamerába (üvegen, a folyadékban vagy az elpusztult levélen keresztül), ott mindegyik sávból jut át valamennyi fény mennyiség. A sötétzöld részekben viszont csak némi zöld fény jut át.)
3. Az elkészült képet Load paranccsal töltjük be. JPEG, BMP, TIF és még pár jól ismert formátumot olvas.
4. Kijelöljük a vizsgálati területet. A DwD módot ad arra, hogy egy célkereszt mozgásával mi jelöljük ki a vizsgált terület közepét, majd ehhez a kör sugarát a pixelek számának megadásával határozhatjuk meg.
5. Beállítjuk az érzékenységet, tehát definiáljuk az élő és az elpusztult levélkékhez tartozó vágási küszöböt. Ezzel azt adjuk meg, melyek azok a képpontok, amelyek elég sötétek (a kék csatornában), ezeket tekintjük élőnek (Algorithm parameters).

6. Megkapjuk az élő, illetve az elpusztult levélkéek által borított terület nagyságát a vizsgálati terület százalékában.

2. ábra

A DwD v.02 képernyőképe

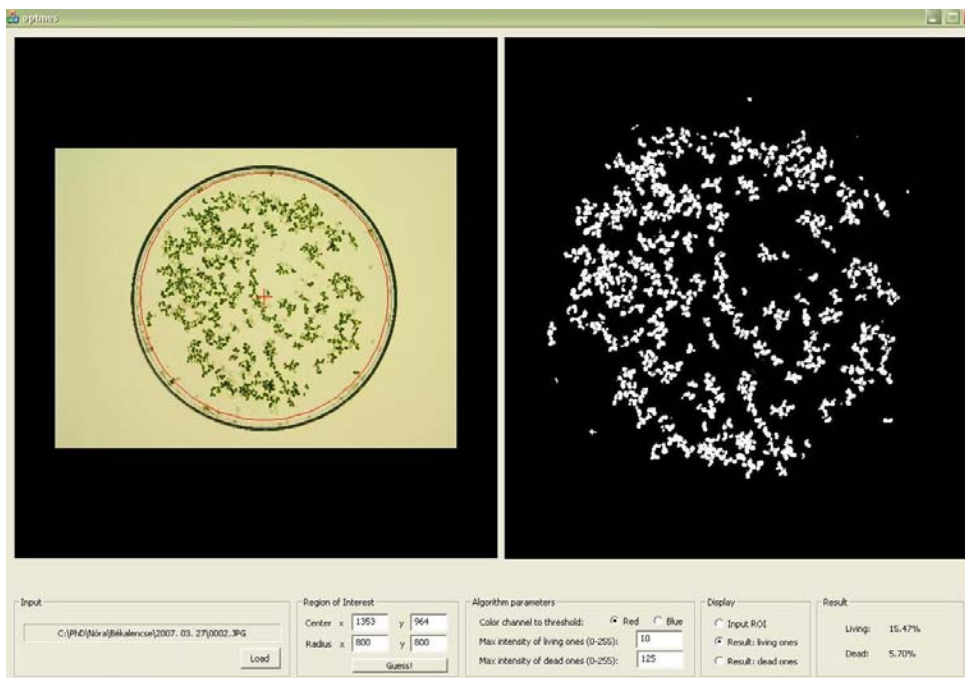


Figure 2: Screen view of Duckweed Detector v.02

A kalibrálás során arra törekedtünk, hogy azt a színintenzitást beállítsuk, amely mellett a levélkéek egyértelműen megkülönböztethetők a háttértől (élő levélkéekhez tartozó vágási küszöb), ill. amely mellett az élő és elpusztult (klorotikus/nekrotikus) levelek megkülönböztethetők (elpusztult levelekhez tartozó vágási küszöb). Az élő levelekhez tartozó vágási küszöb beállítása során a következőképpen jártunk el: az egyes intenzitás értékekhez hozzárendeltük az adott intenzitás mellett élőknek számított területarányt. Az intenzitás megnövelése 15-ről 30-ra a kirajzolt terület 9,7%-os növekedését eredményezte. A következő ugrás során (az intenzitást 30-ról 40-re növeltük) a különbség már csak 4,88% volt, amely alatta maradt a célul kitűzött 5%-os hibahatárnak. Ennek eredményeképpen a beállított vágási küszöb értéke 30. Hasonló mechanizmust követtünk az elpusztult levelekhez tartozó vágási küszöb (intenzitás) beállítása során.

KÖVETKEZTETÉSEK

A szabvány *Lemna* teszt kiértékelésén kívül az eljárás/szoftver alkalmazható (a beállítások módosításával) általában növényfelületek/növényborítottság értékelésére. Másik jelentős alkalmazási terület egy gyakori bioindikációs vizsgálat, a levélnekrozis

értékelése. A nekrotikus foltok a szövet elhalásával jönnek létre, színük adott növénytaxontól függ, de mindenképpen jelentősen eltér a levél eredeti színétől.

Az automatizált mérési módszerek az ökotoxikológiai vizsgálatokban nemcsak megkönnyítik a munkát, de az emberi hiba kiküszöbölésével a tesztek minőségbiztosíthatóságát is javítják.

IRODALOM

- Eberius, M. (2001). Observation Parameters of the Duckweed Growth Inhibition Test: Frond Number – Total Frond Area – Dry Weight.
<http://www.lemnatec.de/Literatur/LT001.pdf>
- ISO/FDIS 20079: Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test
- OECD (2002). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, Draft Guideline 221.
- Suter, G.W. (1993). Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Chelsea, 538.
- USEPA (1997). Superfund Program Representative Sampling Guidance. 3. Biological. Draft.
- Wang W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Res., 52. 7-22.

Levelezési cím (*Corresponding author*):

Kováts Nóra

Pannon Egyetem

Környezetmérnöki és Kémiai Technológia Intézeti Tanszék

8200 Veszprém Pf. 158.

University of Pannonia, Faculty of Engineering,

Department of Environmental Engineering and Chemical Technology

H-8200 Veszprém, P.O.Box 158

Tel.: 36-88-624-655, Fax: 36-88-624-533

e-mail: kovats@almos.vein.hu