

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 16

Issue 2

Gödöllő
2020

A ZAGYVA FOLYÓ KEREKUDVARI KÍMÉLETI SZAKASZÁRÓL SZÁRMAZÓ ÜLEDÉKMINTÁK TOXIKOLÓGIAI VIZSGÁLATA KLASSZIKUS ÉS ALTERNATÍV HALMODELLEKKEL

Bock Illés, Csorbai Balázs, Bokor Zoltán, Garai Edina, Vásárhelyi Erna, Kerekes Flóra, Urbányi Béla, Csenki-Bakos Katalin, Csenki-Bakos Zsolt

Szent István Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék
bock.illes@mkk.szie.hu

Received – Érkezett: 15.11.2019.
Accepted – Elfogadva: 17.12.2020.

Összefoglalás

Kutatásunk során a Zagyva folyó kerekudvari kéméleti szakaszáról, három mintavételi pontról származó üledékmintákat vizsgáltunk több különböző halmodellen. Vizsgálatainkat a modellszervezet zebradánióban (*Danio rerio*), illetve az adott folyószakaszon természetes módon megtalálható jász (*Leuciscus idus*) és domolykó (*Squalius cephalus*) fajokban végeztük. Két különböző embriótoxicitási tesztet végeztünk, egyrészt üledék kontakt tesztet másrészt az üledékmintákból készült szerves kivonattal akut toxicitási tesztet. A jász embriók az üledék kontakt teszt során a legalacsonyabb vizsgálati koncentráción is 100%-os mortalitást mutattak, így ez a faj nem használható ilyen típusú tesztben. A zebradánió és a domolykó esetében szignifikáns különbségeket tapasztaltunk mindhárom mintavételi ponton és a legalacsonyabbat kivéve az összes vizsgálati koncentráción. A szerves kivonattal végzett teszt esetében is a jász embriók mutatták a legmagasabb mortalitást, míg a másik két faj esetében a pusztulás egyik vizsgálati koncentráción sem érte el az 50%-ot. Mivel jelentős különbségeket tapasztaltunk a laboratóriumi modell és az alternatív modellek eredményei között mindkét alkalmazott teszt esetében, így következtetésünk szerint javasolt az üledéktoxikológiai felmérések során az alternatív modell fajok bevonásának megfontolása.

Kulcsszavak: ökotoxikológia, üledék toxikológia, toxicitási teszt, zebradánió

Toxicological assessment of sediment samples from the protected Kerekudvar section of the Zagyva River using classic and alternative fish models

Abstract

In the course of our research, we tested sediment samples from the protected Kerekudvar section of the Zagyva River at three sampling points on different fish models. Our experiments were performed in the model organism zebrafish (*Danio rerio*) and in two species naturally found in the given river section, the orfe (*Leuciscus idus*) and the chub (*Squalius cephalus*). Two different embryo toxicity tests were performed, a sediment contact assay and an acute toxicity test with organic extract from sediment samples. The orfe embryos showed 100% mortality even at the lowest test concentration during the sediment contact assay, so this species cannot be used in this type of test. For zebrafish and chub, significant differences were observed at all three sampling points and at all but the lowest test concentrations. In the case of the organic extract test, the orfe

embryos showed the highest mortality again, while in the case of the other two species, the mortality did not reach 50% at any of the test concentrations. Because we found significant differences between the results of the laboratory model and the alternative models for both tests used, we concluded that it is recommended to consider the inclusion of alternative model species in sediment toxicology surveys.

Keywords: ecotoxicology, sediment toxicology, toxicity test, zebrafish

Bevezetés

Az antropogén eredetű vegyszerek például a peszticidek (Carazo-Rojas et al. 2018), a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) (Sogbanmu et al. 2016) és a klórozott szénhidrogének (Ankley et al. 2011) illetve nehézfémek (Dhanakumar et al. 2015) kibocsátása a tengeri és édesvízi rendszerek természeti erőforrásainak növekvő szennyeződését eredményezi világszerte (Zhang et al. 2016). A legtöbb vegyi anyag molekulái adszorbeálódnak, és végül felhalmozódnak az élővizek üledékében (Bellucci et al. 2016). Az üledékek fontos szerves és szervetlen anyagok (például szén, nitrogén, foszfor és kén) forrásai lehetnek, viszont a bioakkumuláció révén akár olyan szennyező anyagok forrásai is, amelyek az táplálékláncba is bekerülhetnek (Mac & Schmitt 1992). Speciális kémiai, fizikai vagy biológiai körülmények között az üledékszemcsékhez kötött anyagok kioldódhatnak, majd a pórus vagy felszíni vizekbe újra bejuthatnak (Schulze-Sylvester et al. 2016). Ebből kifolyólag az üledékszennyezések hosszú távú ökotoxikológiai hatásokat eredményezhetnek (Li et al. 2019). Következésképpen a vízi ökoszisztémák szennyezettségének jellemzésére a vízfázis toxicitásának meghatározása nem elegendő (Roig et al. 2015). Egy átfogó ökotoxikológiai értékeléshez az üledékek toxicitásának meghatározása is szükséges (Patel et al. 2018).

A vizes területek toxikológiai felmérésekor különböző módszereket alkalmazhatunk a toxikológiai minősítési eljárás során. Elterjedt módszer a halembrióval végzett akut toxikológiai teszt (Embry et al. 2010), melyhez különböző laboratóriumi modellállatokat használnak, mint amilyen például a zebradánió (*Danio rerio*) (Strähle et al. 2012). A zebradánió, mint modellállat, alkalmazása széles körben elterjedt, mivel ismert a faj egyedfejlődése és teljes genomja, illetve tartása és szaporítása egyszerűen kivitelezhető (Braunbeck et al. 2005). Mindezek mellett a zebradánió bizonyítottan jól alkalmazható a szennyező anyagok hatásmechanizmusainak tanulmányozására (Kosmehl et al. 2006).

Kutatásunk során a Zagyva folyó kerekudvari kíméleti szakaszáról származó üledékmintákat vizsgáltunk több különböző halmodellen. Egyrészt üledék kontakt tesztet másrészt az üledékmintákból készült szerves kivonattal akut toxicitási tesztet végeztünk. A zebradánió embriókkal végzett üledék kontakt teszt alkalmas az üledékekből származó szennyező anyagok potenciális toxicitásának vizsgálatára (Hollert et al. 2003). A hagyományos zebradánió modell mellett két olyan fajt vontunk be a vizsgálatokba, melyek az érintett folyószakaszon természetes körülmények között is szaporodnak. Ezek a jász (*Leuciscus idus*), mely vízi növényekre helyezi az ikráit, illetve a domolykó (*Squalius cephalus*), mely az aljzatra ívik. A különböző tesztek eredményeinek összehasonlításával meg kívántuk vizsgálni, hogy a laboratóriumi modellállattal végzett tesztek mennyire képesek reprezentálni az adott élőhelyen ténylegesen előforduló fajokra ható toxikus hatásokat.

A program eredményeként közelebbi képet kaptunk a szabványos akut toxicitási tesztek validitását illetve felhasználhatóságát illetően. Ez hozzásegít minket ahhoz, hogy pontosabb, specifikusabb tesztek tudjunk tervezni a jövőben, és ahhoz, hogy megfelelően tudjuk az eredményeinket kiértékelni és értelmezni. A komplex tesztek elvégzéséből kapott eredmények

felhasználhatóak lehetnek egy adott élőhely vagy ívóhely védelmének és javításának hatékonyabbá tételében.

Anyag és módszer

Teszthalak eredete, fenntartása, szaporítása, ikragyűjtés és ikraválogatás

Zebradánió: A szaporításra kijelölt zebradániók a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén üzemeltetett zebradánió laboratóriumból származnak, ahol ZebTec Multilinking haltartó rendszer (Tecniplast) működik, amely biztosítja a halak számára megfelelő mikrokörnyezeti feltételeket. A vizsgálataink során felhasznált mesterséges víz a haltartó rendszerből származik, melyet a rendszer a gödöllői vezetékes vízből állít elő reverz ozmózis által. A szaporításra kijelölt halakat a szaporítást megelőző nap délután válaszfalal ellátott szaporító medencékbe helyeztük. A szaporítás napján a válaszfalakat eltávolítottuk, az ikrákat összegyűjtöttük és sztereomikroszkóp (Leica) alatt a termékenyült ikrákat leválogattuk.

Jász és domolykó: A szaporítani kívánt jászok a Felsőtárkányi Horgásztóból, míg a domolykók a Budapesten található Hosszúréti-patakból származtak. Az anyahalakat a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének recirkulációs rendszerében tartottuk folyamatosan ellenőrzött körülmények között. Az indukált szaporítást követően az ikrák 7 literes Zuger-üvegekbe kerültek, majd a termékenyült ikrákat szabad szemmel leválogattuk.

Üledék minták vétele, feldolgozása és tárolása

A Zagyva folyó kerekudvari kíméleti szakaszáról, három mintavételi ponton vettünk üledék mintákat (Híd felett, Híd és Híd alatt). A mintákat az üledékréteg felső 5 cm-éből vettük. A nedves mintákat a beszállítás követően szobahőmérsékleten teljesen kiszáritottuk majd egy 1 mm lyukátmérőjű szitán átszitáltuk a nagyméretű növényi és egyéb hulladékok eltávolítása érdekében. A szárított mintákat ezután -20 °C-on tároltuk.

Szerves kivonat készítése

A szerves kivonatok elkészítése *Hollert et al.* (2003) leírása szerint történt. 20 g szárított üledékmintából acetonos (Sigma-Aldrich) kivonatot készítettünk Soxhlet-extraktor használatával (24 óra, 6 ciklus/óra). Ezután zárt rendszerű mintabepárló (Turbovap 500, Biotage) segítségével az acetonos kivonatot majdnem teljes száradásig töményítettük, majd az oldószert DMSO-ra (Sigma-Aldrich) cseréltük. Az így kapott törzsoldat 20000 mg szárított üledékből származó anyag volt 1 ml DMSO-ban feloldva (20000 mg/ml). Az elkészült kivonatokot -20 °C-on tároltuk.

Üledék kontakt teszt

Az üledék kontakt teszt *Hollert et al.* (2003) leírása alapján történt. A vizsgálat nyolc különböző üledék koncentrációban zajlott, melyek minta tartalmi a következők voltak: 3 g, 2,5 g, 2 g, 1,5 g, 1 g, 0,5 g, 0,25 g, 0,1 g. Minden vizsgálat 3 g mintával történt, így az üledékmintákat minden vizsgált koncentráción kiegészítettük 3 g-ra kvarchomokkal (Sigma-Aldrich). A mintákat a kvarchomokkal dörzsmozsárban homogenizáltuk, majd a zebradánió esetében 6-lyukas szövettenyésztő plate-ekbe (Biofil), a másik két faj esetében 5 cm-es petri-csészékbe (Biofil) töltöttük őket. Ezután minden mintára 7 ml mesterséges vizet (ZebTec haltartó rendszerből származó víz) mértünk. A negatív kontroll 3 g kvarchomok volt 7 ml vízzel feltöltve három ismétlésben. A pozitív kontroll 3 g kvarchomok volt 7 ml 3,7 µg/ml 3,4-diklóranilin (Sigma-Aldrich) oldattal feltöltve három ismétlésben. Hogy elkerüljük a mintákban keletkező oxigénhiányból származó problémákat, a feltöltött vizsgálati plate-eket a vizsgálat megkezdése

előtt 72 órán át inkubáltuk, így lehetővé téve az oxigéncserét az üledék és a víz között (Strecker et al. 2011). Az elő-inkubációs időszak leteltével történt az embriók hozzáadása. A zebraadánió esetében minden vizsgálati plate minden lyukába 10 embrió került (4-32 sejtjes állapotban), és minden koncentrációt három ismétlésben vizsgáltunk (n=30). A jáász és domolykó esetében minden petri-csészébe 5 embrió került négy ismétlésben (n=20). A vizsgálati plate-eket és petri-csészéket 120 órán át inkubáltuk a zebraadánió esetében 26 ± 1 °C-on, a jáász és domolykó esetében szobahőmérsékleten 20 ± 1 °C-on. A mortalitásokat 24, 48, 72, 96 és 120 óra elteltével rögzítettük, az eredményeket 120 órás túlélési százaléokban ábrázoltuk.

Szerves kivonat teszt

A legmagasabb vizsgált koncentráció 60 mg/ml, amit a 20000 mg/ml-es törzsoldatból készítettünk el hígítással. A hígítóvíz a ZebTec haltartó rendszerből származó víz volt. A 60 mg/ml-es oldat megfelelt 0,30 %-os DMSO oldatnak, ami az oldószer maximális alkalmazható koncentrációja embriótesztekben. A vizsgált koncentrációk a következők voltak: 60 mg/ml, 30 mg/ml, 15 mg/ml, 7,5 mg/ml, 3,75 mg/ml (Hallare et al. 2005). Két különböző negatív kontrollt alkalmaztunk a vizsgálat során (mesterséges víz és 0,30 % DMSO oldat) valamint egy pozitív kontrollt (3,7 µg/ml 3,4-diklóranilin oldat). Minden vizsgálati koncentrációból és a kontroll oldatokból 2-2 ml-t töltöttünk egy 24 lyukas szövettenyésztő plate (Biofil) lyukaiba (zebraadánió) illetve 10-10 ml-t 5 cm-es petri-csészékbe (jáász és domolykó) 4 ismétlésben. A felhasznált oldatokat az oxigén-telítettség elérése érdekében a vizsgálat megkezdése előtt 24 órán át szellőztettük. A vizsgálati plate minden lyukába és minden petri-csészébe 5 embrió került (n=20). A vizsgálati plate-eket 120 órán át inkubáltuk 26 ± 1 °C-on (zebraadánió), illetve 20 ± 1 °C-on (jáász és domolykó). A mortalitásokat rögzítettük 24, 48, 72, 96 és 120 óra elteltével, az eredményeket túlélési százaléokban ábrázoltuk. A vizsgálati időszak leteltével a rögzített mortalitási értékek alapján LC50 értékeket számoltunk, ahol ez lehetséges volt.

Statisztikai értékelés

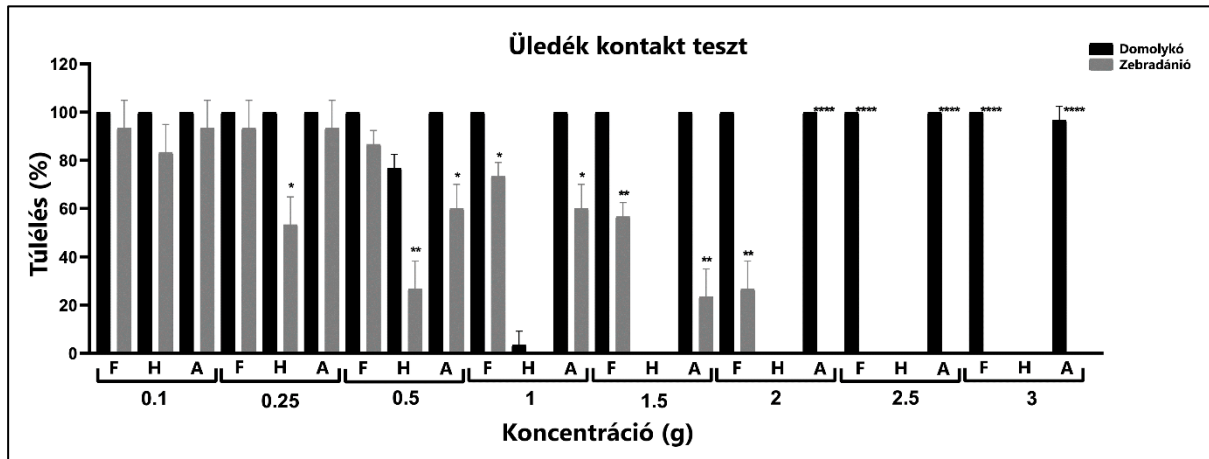
A statisztikai értékelést a GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software) szoftver segítségével hajtottuk végre. Az LC értékek számítását a nem lineáris regressziós modellel készítettük el. A két faj eredményeinek összehasonlításához Mann-Whitney próbát alkalmaztunk.

Eredmények

Üledék kontakt teszt

A jáász embriók az üledék kontakt teszt során a legalacsonyabb vizsgálati koncentráción is 100%-os mortalitást mutattak, ugyanakkor a kvarchomokkal végzett kontroll esetében elhanyagolható volt a pusztulás. Következtetésünk szerint a jáász túlérzékenysége miatt nem használható ilyen típusú tesztben. A zebraadánió és a domolykó esetében tapasztaltunk különbségeket a túlélési százalékokban mindhárom mintavételi pontra vonatkozóan. A 120 órás túlélési eredmények a két fajra együtt, mindhárom mintavételi pontra megadva láthatók (1. ábra).

1. ábra: Az üledék kontakt teszt túlélési eredményei a három mintavételi pontra vonatkozóan



(F – Híd felett, H – Híd, A – Híd alatt) a különböző koncentrációkon, három ismétlés átlagában a szórás feltüntetésével, 120 órás expozíció után. A két faj túlélési eredményeit egymáshoz hasonlítottuk az egyes koncentrációkon és mintavételi pontokon, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük.

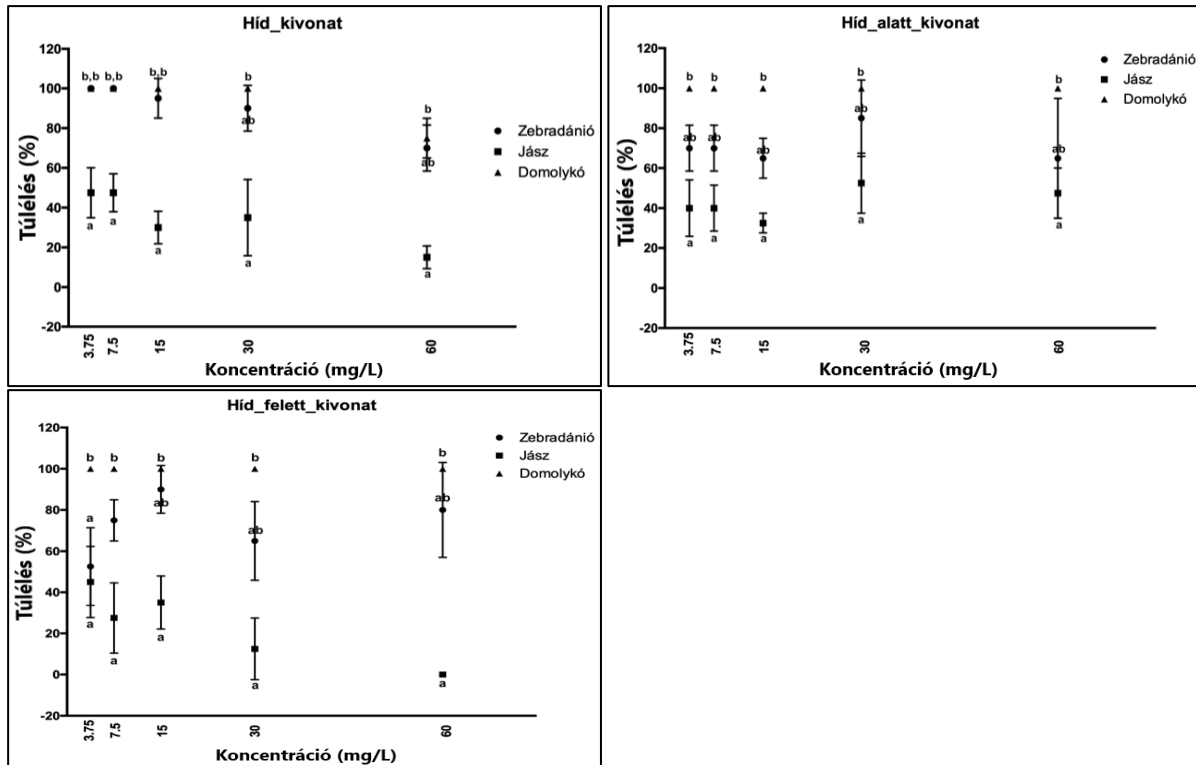
Szignifikáns különbségeket tapasztaltunk 0,25 g koncentráción a két Híd eredmény között ($p < 0,05$), 0,5 g koncentráción a két Híd eredmény ($p < 0,01$) és a két Híd alatt eredmény ($p < 0,05$) között, 1 g koncentráción a két Híd felett ($p < 0,05$) és a két Híd alatt eredmény között ($p < 0,05$), 1,5 g koncentráción a két Híd felett ($p < 0,01$) és a két Híd alatt eredmény között ($p < 0,01$), 2 g koncentráción a két Híd felett ($p < 0,01$) és a két Híd alatt eredmény között ($p < 0,0001$), 2,5 g koncentráción a két Híd felett ($p < 0,0001$) és a két Híd alatt eredmény között ($p < 0,0001$) valamint 3 g koncentráción a két Híd felett ($p < 0,0001$) és a két Híd alatt kapott között ($p < 0,0001$).

Szerves kivonat teszt

A szerves kivonattal végzett toxicitási tesztekben mindhárom vizsgált faj eredményei között tapasztaltunk szignifikáns különbségeket is. A 120 órás LC50 értékek a jász esetében a Híd felett mintában 4,00 mg/ml, a Híd mintában 1,29 mg/ml és a Híd alatt mintában 16,60 mg/ml voltak. A domolykó és a zebradánió esetében a pusztulás egyik vizsgálati koncentráción sem érte el az 50 %-ot. A 120 órás koncentráció-hatás görbék mindhárom fajra együtt, mindhárom mintavételi pontra megadva láthatók (2. ábra). Mivel a pusztulási százalékok mindhárom faj esetében egyértelmű különbségeket mutattak, így ez is megerősíti az alternatív modellállatok használatának szükségességét.

2. **ábra: A szerves kivonat teszt túlélési eredményei a három mintavételi pontra vonatkozóan a különböző koncentrációkon, négy ismétlés átlagában a szórás feltüntetésével, 120 órás expozíció után**

/Az egymáshoz viszonyított szignifikáns különbségeket betűkkel jelöltük (a, b)/



Mint az az ábrákból is látható, tapasztaltunk különbséget a laboratóriumi modell és a vizsgálati helyszínen természetes körülmények között szaporodó faj eredményei között, ami igazolja, hogy szükséges lehet alternatív modellállatokat felhasználni az üledéktoxikológiai felmérések során. Az eredményeink alapján a domolykó alkalmas faj erre a célra, mivel az általunk alkalmazott tesztekben statisztikailag értékelhető eredményeket adott.

Eredmények értékelése

Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az üledéktoxikológiai vizsgálatok során javasolt a toxicitási tesztekbe a hagyományos laboratóriumi modellek mellett alternatív modell fajokat is bevonni, amennyiben ez lehetséges. A vizsgálataink alapján a két alternatív modell faj közül elsősorban a domolykó alkalmas erre, mivel természetes körülmények között is az aljzatra ívik, így különösen alkalmas az üledék kontakt tesztben való alkalmazásra.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a MAHOP-2.1.1-2016-2017-00002, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008, NVKP_16-1-2016-0003 és a FEKUT2019: TUDFO/47138/2019-ITM pályázatok támogatták.

Irodalomjegyzék

- Ankley, G. T., Cook, P. M., Carlson, A. R., Call, D. J., Swenson, J. A., Corcoran, H. F., Hoke, R. A. (2011): Bioaccumulation of PCBs from Sediments by Oligochaetes and Fishes: Comparison of Laboratory and Field Studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49.10. 2080-2085.
- Bellucci, L. G., Cassin, D., Giuliani, S., Botter, M., Zonta, R. (2016): Sediment pollution and dynamic in the Mar Piccolo of Taranto (southern Italy): insights from bottom sediment traps and surficial sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 23. 13. 12554-12565.
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *Altex*, 22. 87-102.
- Carazo-Rojas, E., Pérez-Rojas, G., Pérez-Villanueva, M., Chinchilla-Soto, C., Chin-Pampillo, J. S., Aguilar-Mora, P., Alpízar-Marín, M., Masís-Mora, M., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Vryzas, Z. (2018): Pesticide monitoring and ecotoxicological risk assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem. *Environmental Pollution*, 241. 800-809.
- Dhanakumar, S., Solaraj, G., Mohanraj, R. (2015): Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113. 145-151.
- Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., Léonard, M. A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G. (2010): The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97. 79-87.
- Hallare, A. V., Kosmehl, T., Schulze, T., Hollert, H., Köhler, H-R., Triebkorn, R. (2005): Assessing contamination of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the Total Environment*, 347. 254-271.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T. (2003): A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments*, 3. 197-207.
- Kosmehl, T., Hallare, A. V., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H. (2006): A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25. 2097-2106.
- Li, R., Hua, P., Zhang, J., Krebs, P. (2019): A decline in the concentration of PAHs in Elbe River suspended sediments in response to a source change. *Science of the Total Environment*, 663. 438-446.
- Mac M. J., Schmitt C. J. (1992): Sediment bioaccumulation testing with fish. In: Burton Jr. G. A. szerk. (1992): *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 479 pp., 295-308.
- Patel, P., Raju, N. J., Reddy, S. R., Suresh, U., Sankar, D. B., Reddy, T. V. K. (2018): Heavy metal contamination in river water and sediments of the Swarnamukhi River Basin, India: risk assessment and environmental implications. *Environmental Geochemistry and Health*, 40. 2. 609-623.
- Roig, N., Sierra, J., Nadal, M., Moreno-Garrido, I., Nieto, E., Hampel, M., Gallego, E. P., Schuhmacher, M., Blasco, J. (2015): Assessment of sediment ecotoxicological status as a

complementary tool for the evaluation of surface water quality: the Ebro river basin case study. *Science of the Total Environment*, 503-504. 269-278.

- Schulze-Sylvester, M., Heimann, W., Maletz, S., Seiler, T-B., Brinkmann, M., Zielke, H., Schulz, R., Hollert, H.* (2016): Are sediments a risk? An ecotoxicological assessment of sediments from a quarry pond of the Upper Rhine River. *Journal of Soils and Sediments*, 16. 3. 1069-1080.
- Sogbanmu, T. O., Nagy, E., Philips, D. H., Arlt, V. M., Otitoloju, A. A., Bury, N. R.* (2016): Lagos lagoon sediment organic extracts and polycyclic aromatic hydrocarbons induce embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects in *Danio rerio* (zebrafish) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 23. 14. 14489-14501.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T.* (2012): Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments – A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33. 128-132.
- Strecker, R., Seiler, T-B., Hollert, H., Braunbeck, T.* (2011): Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153. 318-327.
- Zhang, F., Zhang, R., Guan, M., Shu, Y., Shen, L., Chen, X., Li, T.* (2016): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and Pb isotopic ratios in a sediment core from Shilianghe Reservoir, eastern China: Implying pollution sources. *Applied Geochemistry*, 66. 140-148.