



---

**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA**

**Cink-oxid, titán-dioxid és grafén-oxid nanorészecskék  
környezetre gyakorolt hatása – környezettoxikológiai vonatkozások és  
alkalmazhatóság bioremediációban**

Tézisfüzet

**Németh Imre**

Témavezető: **Dr. Molnár Mónika**  
egyetemi docens

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék  
Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport



2025

## 1. Bevezetés

A nanotechnológia fejlődése az emberi társadalom számos területén hozott jelentős előrelépést, azonban a nanoméretű anyagok széles körű alkalmazása miatt felmerülő környezeti és biológiai kérdések még mindig megválaszolásra várnak. A nanorészecskék, melyek mérete 1–100 nm közötti tartományban mozog<sup>1</sup>, számos iparágban - mint az elektronika, az orvostudomány, az energiaipar és a környezettechnológia - jelentős potenciált hordoznak. A nanorészecskék egyedülálló fizikai és kémiai tulajdonságai forradalmi alkalmazásokat eredményeznek, ugyanakkor felvetik annak szükségességét, hogy részletesen megvizsgáljuk potenciális környezeti és biológiai hatásait.

A hagyományos szennyezőanyagokkal szemben a nanorészecskék eltérő viselkedést mutathatnak a környezetben, például az aggregáció, a reaktivitás vagy a biológiai rendszerekkel való kölcsönhatások révén. Ennek következtében, a hagyományos szennyezőanyagok toxikológiai profiljaival összehasonlítva ezek az új anyagok gyakran teljesen eltérő dinamikát és toxicitást mutatnak. Ennek megfelelően, a kutatási módszereknek és a környezeti hatások értékelésének is adaptálódnia kell az új kihívásokhoz.

## 2. Irodalmi háttér

Napjainkban a nanotechnológia egyre nagyobb figyelmet kap a rendkívül sokrétű felhasználási területeinek köszönhetően. A nanorészecskék egyre növekvő felhasználása miatt azok környezetbe jutása is fokozódik, emiatt kritikus fontosságú, hogy megértsük az élővilág és a nanoméretű anyagok között fellépő kölcsönhatásokat, illetve ezek következményeit. Bár a nanoanyagok speciális tulajdonságainak kezelésére már vannak irányelvek, nincs a hatásvizsgálatokra alkalmazott egységes vizsgálati metodika, illetve a tudományos és szabályozási irányelvek felülvizsgálata során bebizonyosodott, hogy a nanoanyagokra vonatkozó részletesebb követelményekre és vizsgálatokra is szükség van.

### **2.1. Nanorészecskék felhasználása és sorsa**

A nanorészecskék egyedi jellemzőkkel rendelkeznek, mint a kis méret, összetétel, felületi szerkezet, oldhatóság, alak és aggregációra való képesség. Ezek a tulajdonságaik módosíthatók, melynek következtében számos területen előnyben részesítik őket a nagyobb méretű anyagokkal szemben<sup>2</sup>.

A nanorészecskék használata jelentős mértékben növekedett a tudomány, orvostechika és gyógyszerészet, elektronika, távközlés és egyéb ipari területeken. Különösen a fém-oxid nanorészecskék alkalmazása nyert teret a mezőgazdaságban, háztartási cikkekben és az energiatermelésben. A titán-dioxid (TiO<sub>2</sub>) és cink-oxid (ZnO) nanorészecskék a leggyakrabban alkalmazott nanoanyagok kozmetikai termékekben, például fényvédő krémekben, testápolókban, szappanokban, szájvízben<sup>3</sup>, továbbá a TiO<sub>2</sub> megtalálható étrend-kiegészítőkben, szósókban, növényi alapú tejszínhelyettesítőkben és egyes édességekben is<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Martínez, G., Merinero, M., Pérez-Aranda, M., Pérez-Soriano, E.M., Ortiz, T., Begines, B., Alcludia, A. (2021) Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. *Materials* 14. <https://doi.org/10.3390/ma14010166>

<sup>2</sup> Hughes, S., Asmatulu, E. (2021) Nanotoxicity and nanoecotoxicity: Introduction, principles, and concepts. In: Kumar, V., Guleria P., Ranjan, S., Dasgupta, N., Lichtfouse, E. (eds). *Nanotoxicology and nanoecotoxicology* Vol. 1. Environmental chemistry for a sustainable world Springer International Publishing, Cham, pp 1–19 [https://doi.org/10.1007/978-3-030-63241-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-63241-0_1)

<sup>3</sup> Adawi, H.I., Newbold, M.A., Reed, J.M., Vance, M.E., Feitshans, I.L., Bickford, L.R., Lewinski, N.A. (2018) Nano-Enabled personal care products: Current developments in consumer safety. *NanoImpact* 11:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.08.002>

<sup>4</sup> Ropers, M-H., Terrisse, H., Mercier-Bonin, M., Humbert, B. (2017) Titanium dioxide as food additive. In: Janus M (ed). *Application of Titanium dioxide*. *IntechOpen*, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68883>

A nanorészecskék ipari és háztartási felhasználásának jelentős emelkedése következtében azok elkerülhetetlenül megjelennek a környezetben, és az ökoszisztémákra kifejtett hatásuk révén figyelmet kell fordítani azok lehetséges kockázataira. A környezetben felhalmozódhatnak például vízben, üledékekben, talajban, szennyvíziszapban és levegőben<sup>5</sup>.

A nanorészecskék különböző biotikus vagy abiotikus transzformációs folyamatokon mehetnek keresztül, melyek döntő szerepet játszanak a nanorészecskék biológiai hozzáférhetőségének és toxicitásának alakulásában<sup>6</sup>. Ennek következtében toxikus hatású oxidatív stresszt idézhetnek elő reaktív oxigén származékok (Reactive Oxygen Species; ROS) képzésén keresztül, ami például a növények általi felszívódás, vagy a talajban és vízi ökoszisztémában lévő élőlényekbe jutás révén potenciális veszélyt jelenthet az emberi egészségre is, mivel bioakkumuláció útján is bekerülhetnek az élelmiszerláncba<sup>7</sup>.

## **2.2. Nanoökotoxikológia és szabályozása**

A nanoökotoxikológia célja a nano mérettartományban lévő anyagok ökoszisztémákra gyakorolt hatásainak azonosítása és előrejelzése. Ennek érdekében figyelembe veszi a nanoanyagok környezetbe jutásának lehetséges útvonalait és sorsát, valamint az élőlényekben bekövetkező funkcionális változásokat, sejt szinttől a komplex közösségekig.

Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a nanorészecskék toxicitásáról környezeti koncentrációban, valamint környezetileg releváns fajokra és komplex rendszerekre nézve. Emellett környezeti koncentrációjuk meghatározása is kihívást jelent, ami szintén korlátozza a nanorészecskék releváns kvantitatív kockázatértékelését. A nanoanyagok ökotoxicitásának felmérésére vonatkozó növekvő igény miatt szükségessé vált a hagyományos ökotoxikológiai szabvány tesztmódszerek továbbfejlesztése. Habár az egyéb anyagok toxicitásának felmérésére szolgáló standard ökotoxikológiai tesztmódszerek a nanoanyagokra is alkalmazhatók, adaptációra és módosításukra van szükség.

A nanoanyagok különböző élőlényekre gyakorolt hatásainak vizsgálata alapján a nanoanyagok hatásai megnyilvánulhatnak viselkedésszerű, morfológiai, sejtszintű, molekuláris vagy genetikai hatásokban<sup>8</sup>. Az alapvetően biztonságosnak tekintett nanorészecskék esetén is szükségesek szűrővizsgálatok, míg az elővigyázatosság elve alapján végzett átfogó vizsgálatok hosszú távú *in vivo* tesztelést igényelnek. A folyamatosan megjelenő új nanoanyagok releváns tesztelése hosszú időt vesz igénybe kockázatuk jellemzéséhez, amire megoldást jelenthetne, ha kevésbé szigorú, de továbbra is kockázatkerülő megközelítéseket alkalmaznának<sup>9</sup>.

A nanoanyagok kockázataival kapcsolatos átfogó kutatások hiánya megnehezíti azok környezetre gyakorolt potenciális káros hatásainak felmérését és megelőzését. Ez szükségessé teszi a nanoanyagok környezeti kockázataival kapcsolatos kutatások metodikai megközelítésének fejlesztését és a technológiai fejlesztéseket egyaránt. Mivel a toxikológiai és egyéb vizsgálatok gyakran időigényesek, javaslatok születtek az ún. elővigyázatossági megközelítés kialakítására és alkalmazására a nanotechnológiával és nanoanyagokkal kapcsolatban, így elkerülve a környezeti kockázatok kialakulását.

---

<sup>5</sup> Mishra, S., Sundaram, B. (2023) Fate, transport, and toxicity of nanoparticles: An emerging pollutant on biotic factors. *Process Saf Environ Prot* 174:595–607. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.04.037>

<sup>6</sup> Rajput, V., Minkina, T., Mazarji, M., Shende, S., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Burachevskaya, M., Chaplygin, V., Singh, A., Jatav, H. (2020) Accumulation of nanoparticles in the soil-plant systems and their effects on human health. *Ann Agric Sci* 65:137–143. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.08.001>

<sup>7</sup> Jumle, K., Lakhawat, S.S., Ajmera, H., Thakuria, B., Sharma, V., Jain, V., Kumar, V., Singh, S., Kumar, A., Malik, N., Kothari, S.L., Kumar, S., Sharma, P.K. (2025) Chapter 9 - Nanoparticles bioaccumulation an emerging threat to ecosystem. In: Joshi, S., Dua, P., Sarma, H., Velmurugan, P. (eds) *Advances in biotechnology and bioengineering. One- and two-dimensional nanomaterials*. Academic Press, pp 223–235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-23703-4.00009-1>

<sup>8</sup> Boros, B.V., Ostafe, V. (2020) Evaluation of ecotoxicology assessment methods of nanomaterials and their effects. *Nanomaterials* 10(4):610. <https://doi.org/10.3390/nano10040610>

<sup>9</sup> Choi, J.Y., Ramachandran, G., Kandlikar, M. (2009) The impact of toxicity testing costs on nanomaterial regulation. *Environ Sci Technol* 43:3030–3034. <https://doi.org/10.1021/es802388s>

Ugyanakkor többszintű kockázatértékelési stratégiára lenne szükség, amely hasonló az EU vegyi anyagok szabályozásával kapcsolatos REACH jogszabályához. A Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization; ISO) olyan nanotechnológiához kapcsolódó szabványokat fejleszt, amelyek kiegészítik a hatósági tesztelési módszereket<sup>10</sup>.

A szabályozás szempontjából további probléma, hogy az EU-ban egyes jogszabályok saját meghatározást használnak a nanoanyagokra, mint például a Kozmetikai termékek szabályozása és az Új élelmiszerek szabályozása, míg mások egyáltalán nem rendelkeznek nanoanyag meghatározással, például az Élelmiszerekkel érintkező műanyagok szabályozása.

### 2.2.1. Mikrobiális kommunikáció befolyásolása nanorészecskékkel

A kvórum érzékelés (Quorum Sensing; QS), vagyis a sejt-sejt közötti kommunikáció egy sejtsűrűségtől függő jelátviteli folyamat. A baktériumok egysejtű élőlények, de közösségként képesek olyan komplex feladatok elvégzésére, amit önállóan nem tudnának véghez vinni. Ehhez szükséges a sejtek közötti kommunikáció, mely szignálmolekulák segítségével történik. A szignálmolekulák termelése és extracelluláris térbe történő kibocsátása folyamatos, de kicsi sejtkoncentráció esetén kevés az esélye, hogy az egyik sejt által termelt szignál egy másik sejten levő receptorhoz kötődjön. A baktériumkolónia szaporodásával egyre több sejt, egyre több szignált bocsát ki a környezetébe, és amikor a szekretált jelmolekula (és a receptorokhoz kötődésük) elér egy bizonyos koncentrációt, megváltozik különböző gének átírása, illetve expressziójának mértéke<sup>11</sup>. Ennek következtében a baktériumok összehangolt működésbe kezdenek, ami lehetővé teszi olyan tulajdonságok (például biolumineszcencia, biofilmképzés, sporuláció, pigment termelés) kifejeződését, amelyek kulcsfontosságúak a környezeti feltételekhez való alkalmazkodás szempontjából.

A kvórum csillapítás (Quorum Quenching; QQ) során a bakteriális kommunikáció mértékét csökkentik például a szignálmolekulák degradálásával, vagy olyan gátlóanyagok segítségével érik el, melyek különböző mechanizmuson keresztül tudják akadályozni a sejtek közötti kommunikációt<sup>12</sup>. Az inhibitorok természetes vegyületek vagy szintetikus származékok is lehetnek, így a nanorészecskék is alkalmazhatóak QQ céljából. Az elmúlt évtizedben a nanorészecskék a bakteriális kommunikációval kapcsolatos kutatások középpontjába kerültek kvórum csillapító, valamint antimikrobás hatásuk miatt. A fém-oxid nanorészecskék, mint potenciális kvórum-gátló anyagok a virulencia és a biofilmképzés csökkentése céljából az elmúlt években kerültek fókuszpontba<sup>13</sup> egyéb, részletesebben tanulmányozott anyagok mellett. Átfogó, molekuláris és genetikai szintű kutatások szükségesek annak megértésére, hogy ezek a „nanofegyverek” miképp gátolják a QS rendszereket<sup>14</sup>.

---

<sup>10</sup> Tschiche, H.R., Bierkandt, F.S., Creutzenberg, O., Fessard, V., Franz, R., Giese, B., Greiner, R., Heinz, K., Haase, A., Hartwig, A., Hund, K., Iden, P., Kromer, C., Loeschner, K., Mutz, D., Rakow, A., Rasmussen, K., Rauscher, H., Richter, H., Schoon, J., Schmid, O., Som, C., Tovar, G.E.M., Westerhoff, P., Wohlleben, W., Luch, A., Laux, P. (2022) Environmental considerations and current status of grouping and regulation of engineered nanomaterials. *Environ Nanotechnology, Monit Manag* 18:100707. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100707>

<sup>11</sup> Papenfort, K., Bassler, B.L. (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14:576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>

<sup>12</sup> Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., Pan, J. (2020) Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Front Microbiol* 11:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>

<sup>13</sup> Hayat, S., Muzammil, S., Shabana, Aslam B., Siddique, M.H., Saqalein, M., Nisar, M.A. (2019) Quorum quenching: role of nanoparticles as signal jammers in Gram-negative bacteria. *Future Microbiol* 14:61–72. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0257>

<sup>14</sup> Salkar, K., Charya, L. (2023) Chapter 11 - Application of nanoparticles as quorum quenching agent against bacterial human pathogens: a prospective therapeutic nanoweapon. In: Morajkar, P., Naik, M. (eds) *Advances in nano and biochemistry. Progress in Biochemistry and Biotechnology*. Academic Press, pp 261–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95253-8.00011-5>

### **2.3. Nano-bioremediáció**

A szennyezett talajok kockázatcsökkentésére különböző technológiákat alkalmazhatunk, melyek közt fontos szerepet kapnak – szerves szennyezőanyagok esetén – a biodegradáción alapuló bioremediációs technikák, melyeknek fő célja a biodegradáció intenzifikálása. A szennyezett területen végbemenő biodegradáció hatékonysága növelhető mikroorganizmusok és/vagy enzimek hozzáadásával például oltóanyag formájában, mely technikát bioaugmentációnak nevezünk<sup>15</sup>. Az enzim-alapú bioremediáció egy hatékony eljárás lehet a rekalcitráns xenobiotikumok (antropogén eredetű szennyezőanyagok) szennyezett közegből, környezetbarát módon történő eltávolítására.

A közelmúltban új, nanoanyagokat alkalmazó technikák jelentek meg, melyek ígéretes lehetőséget teremtenek a különböző szennyezőanyagok általi környezeti kockázat csökkentésére, így a szennyezett területek tisztítására és a szennyezés kontrollálására.

A nanoanyagok és/vagy nanotechnológia, valamint a bioremediációs eljárás együttes alkalmazását nano-bioremediációnak nevezzük<sup>16</sup>.

Számos technika áll rendelkezésre a nano-bioremediációra, ideértve a nanorészecskék által fokozott mikrobiális aktivitáson alapuló biodegradáció sebességének fokozását, a nanorészecskék által immobilizált mikrobiális sejtek és enzimek használatát, a nanorészecskék által közvetített elektrontranszfert, valamint az integrált nano-biodegradációt, amely a nanoanyagok eltérő hatásmechanizmusainak és a különböző biodegradációs útvonalaknak együttes alkalmazása a policiklusos aromás szénhidrogénekkal (PAH) szennyezett talajok komplex remediációja érdekében<sup>17</sup>.

Több nanorészecske esetén (beleértve ZnO-t, TiO<sub>2</sub>-t) leírták, hogy javíthatják a PAH eltávolítás hatékonyságát<sup>18</sup>, ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a nanorészecskék környezetben történő alkalmazása, például talajremediációs céllal kedvezőtlen hatásokat is okozhat<sup>19</sup>.

## **3. Célkitűzések**

Kutatómunkám fő aspektusai a környezeti kockázatfelmérés és kockázatcsökkentés, melyek fókuszában különböző nanoanyagok állnak.

Kutatásom első fázisában grafén-oxid (nGO), illetve cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék környezetre gyakorolt hatását vizsgáltam és jellemeztem környezettoxikológiai megközelítéssel. Mivel fém-oxid nanorészecskék esetén már sok tanulmány foglalkozott toxikus hatásuk felméréseivel egy fajt alkalmazó rendszerekben, ezért nZnO és nTiO<sub>2</sub> esetén az eddig kevésbé kutatott vízi ökoszisztéma mikrobiális közösségére gyakorolt hatásuk feltérképezése volt az egyik fő célkitűzésem. Hasonlóképpen nGO esetén is felmértem az édesvízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatását.

---

<sup>15</sup> Gao, D., Zhao, H., Wang, L., Li, Y., Tang, T., Bai, Y., Liang, H. (2022) Current and emerging trends in bioaugmentation of organic contaminated soils: A review. *J Environ Manage* 320:115799. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115799>

<sup>16</sup> Chauhan, P., Imam, A., Kanaujia, P.K., Suman, S.K. (2023) Nano-bioremediation: an eco-friendly and effective step towards petroleum hydrocarbon removal from environment. *Environ Res* 231:116224. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116224>

<sup>17</sup> Gupta, N., Koley, A., Banerjee, S., Ghosh, A., Hoque, R.R., Balachandran, S. (2024) Nanomaterial-mediated strategies for enhancing bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A systematic review. *Hybrid Adv* 7:100315. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2024.100315>

<sup>18</sup> Eldos, H.I., Zouari, N., Saeed, S., Al-Ghouti, M.A. (2022) Recent advances in the treatment of PAHs in the environment: Application of nanomaterial-based technologies. *Arab J Chem* 15:103918. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103918>

<sup>19</sup> Ge, Y., Schimel, J.P., Holden, P.A. (2011) Evidence for negative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environ Sci Technol* 45:1659–1664. <https://doi.org/10.1021/es103040t>

Továbbá, mivel a nGO hatásméréséhez kapcsolódóan viszonylag kevés komplex kutatás áll rendelkezésre egy fajt alkalmazó integrált tesztrendszerek alkalmazásával, ezért eltérő trófikus szintekről származó tesztorganizmusok koncentráció-válasz összefüggései alapján, a tesztelt GO nanoanyagok hatásos koncentrációinak és környezeti kockázatának meghatározását is célul tűztem ki.

A nanorészecskék vízi ökoszisztémára gyakorolt hatásának megállapítására célt volt továbbá egy könnyen alkalmazható metodikai módszer ajánlása, mely már kis koncentrációban is előre tudja jelezni a nanorészecskék által okozott szignifikáns eltéréseket a mikrobiális diverzitásban, illetve aktivitásban. Ennek kapcsán a Biolog EcoPlate™ tesztrendszer alkalmazhatóságát, mint relatíve olcsó és gyors technika, mértem fel. Továbbá a Biolog EcoPlate™ mérések alapján nyert adatokból származtatható különböző vizsgálati végpontok érzékenységének felmérésével célt volt olyan vizsgálati végpont(k) meghatározása, melyek jól tükrözik a nanorészecskék által kiváltott hatásokat.

A nanorészecskék bakteriális kommunikációra gyakorolt hatásának vizsgálata egy viszonylag új kutatási terület, melynek kapcsán több ellentmondásos eredmény is született. Ehhez kapcsolódva célt volt, hogy összehasonlítsam két fém-oxid nanorészecske (nZnO és nTiO<sub>2</sub>) hatását a *Pseudomonas aeruginosa* életképességére és QS-vezérelt, különböző szignálmolekulák által szabályozott folyamataira (biofilmképzés, pioverdin termelés) vonatkozólag. Ennek során a tesztelt nanorészecskék koncentráció- és időfüggő hatását, valamint a citotoxikus hatását is vizsgáltam.

Doktori munkám második fázisa egy hatékony és környezetbarát kockázatsökkentési biotechnológia fejlesztéséhez kapcsolódik. Ennek során olyan enzim-alapú bioremediációs eljárás paramétereinek kidolgozása és megvalósítása volt a célkitűzésem PAH-vegyületekkel szennyezett talajokra, amivel igazolható a technológia és az alkalmazott enzimek hatékonysága. Bioinformatikai úton tervezett új PAH-bontó enzimek (gentizát-dioxigenáz és kataláz-peroxidáz) biodegradációs hatékonyságát vizsgáltam, melynek során a PAH-okkal szennyezett talaj mikrobiális aktivitásának és funkcionális diverzitásának meghatározására is felmértem a Biolog EcoPlate™ alkalmazhatóságát.

További célt volt értékelni a nZnO PAH-bontó enzimekre, ez által a bioremediáció hatékonyságára gyakorolt hatását, továbbá felmérni a nZnO talajban élő őshonos mikroflóra aktivitására és diverzitására kifejtett hatását.

## **4. Kísérleti metodika**

Kutatási munkám során a Sigma-Aldrich Inc.-től származó nano cink-oxidot (melynek átlagos részecskemérete 40 nm alatti), az Evonik Resource Efficiency GmbH-től beszerzett AERODISP® VP Disp. W2730X nano titán-dioxidot (90% anatáz és 10% rutil; átlagos részecskemérete 16 nm alatti), továbbá a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén előállított AF 96/97 és PM 995 típusú grafén-oxid nanorészecskéket (melyek átlagos kristálmérete 8,24, illetve 6,74 nm) használtam.

### **4.1. Nanorészecskék élővilágra gyakorolt hatásának felmérése**

A nanorészecskék élővilágra gyakorolt hatását több, eltérő típusú és érzékenységgű tesztrendszerben tanulmányoztam, melyek között voltak egy fajt és több fajt (mikrobiális közösséget) alkalmazó ökotoxikológiai rendszerek, szubletális és letális tesztelési végpontokkal.

A nGO környezeti kockázatfelmérése során az alábbi tesztrendszereket és végpontokat alkalmaztam:

- *Aliivibrio fischeri* (baktérium)
  - Biolumineszcencia intenzitás mérése
  - Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése
- *Escherichia coli* (baktérium)
  - Szaporodás
  - Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése
  - Reaktív oxigén származék termelés intenzitásának mérése
  - Genotoxicitás vizsgálata SOS ChromoTest™ alkalmazásával
- *Tetrahymena pyriformis* (protozoa)
  - Szaporodás
  - Légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának mérése
- *Panagrellus redivivus* (fonálféreg)
  - Szaporodás
- *Sinapis alba* (fehér mustár) és *Triticum aestivum* (közönséges búza)
  - Csírázóképeség
  - Gyökér- és szárhossznövekedés

Ezen tesztek eredményei alapján a koncentráció-válasz összefüggés statisztikai elemzésével meghatároztam a 20%-os gátló hatást okozó hatásos koncentrációértékeket (EC<sub>20</sub>). A legkisebb EC<sub>20</sub> értéket figyelembe véve, konzervatív megközelítéssel megadható a nGO-k PNEC (előrejelzés szerint károsan még nem ható koncentráció) értéke, mely a környezeti kockázati tényező (RQ) meghatározásához szükséges. Az RQ értékét az előre jelezhető környezeti koncentráció (PEC) és a PNEC hányadosaként kapjuk meg. Minél nagyobb az RQ értéke, annál nagyobb veszélyt jelent a környezetbe került vegyi anyag.

A nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérését laboratóriumi mikrokozmosz rendszerekben végeztem, valós környezetből (Balaton) származó édesvízzel. Ennek során az idő és a koncentráció függvényében mértem a légzési láncban résztvevő enzimek aktivitását, valamint Biolog EcoPlate™ használatával eltérő indexeket és végpontokat határoztam meg (Szubsztrátszám (SR), Átlagos színfejlődési érték (AWCD), Szubsztrátszoportonkénti átlagos színfejlődési érték (SAWCD), Görbe alatti terület (AUC), Shannon-index (H), Shannon-egyenletesség (E), Simpson-index (D), McIntosh-index (U), Gini-index (G)), melyek a mikrobiális aktivitás jellemzésére szolgálnak.

A fém-oxid nanorészecskék mikrobákra gyakorolt hatását a bakteriális kommunikáció befolyásolásával összefüggésben is feltérképeztem. Ennek során a *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 (ATCC 27853) törzs biofilmképzésére, valamint pioverdin sziderofór termelésére gyakorolt hatást vizsgáltam. Továbbá felmértem a baktérium szaporodását, enzimaktivitását, ROS termelését annak érdekében, hogy a toxikus hatást el tudjam különíteni a bakteriális kommunikációra gyakorolt hatástól.

#### **4.2. Policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok bioremediációja**

A PAH-okkal szennyezett talajok kármentesítési eljárásának kidolgozására metagenomikai módszerekkel tervezett enzimek (kataláz-peroxidáz (E39), gentizát 1,2-dioxigenáz (E99 és E105)) működőképességét és hatékonyságát vizsgáltam két egymásra épülő lépcsőben mikrokozmosz rendszerekben. Az első fázisban 1 mg tisztított enzimet, valamint 20 mmol kalcium-peroxidot (CaO<sub>2</sub>) adtam 200 g szennyezett talajhoz különböző kombinációkban.

Kutatásom második fázisában a nZnO PAH-okkal szennyezett talaj bioremediációjának hatékonyságára kifejtett hatását is felmértem a technológiai mikrokozmosz rendszerekben.

A szennyezett talajhoz 200 és 1000 mg/kg koncentrációban adtam nZnO-t, valamint 10 mmol kalcium-peroxidot (CaO<sub>2</sub>-t) és enzimeket (E39 és E105) különböző kombinációkban, hogy felmérjem a remediáció hatékonyságára gyakorolt hatásukat.

A különböző kezelések hatékonyságának felmérését a szennyezőanyagok koncentrációjának gázkromatográfiás analitikai mérése alapján, továbbá a mikrobiális aktivitás meghatározásán keresztül végeztem. Utóbbihoz a korábban leírt Biolog EcoPlate™ eszközt használtam és az abból számított végpontok alapján jellemeztem az észlelt hatást.

### **4.3. Statisztikai analízis**

A különböző mérési módszerek során tesztrendszerrel függően 3–6 párhuzamossal dolgoztam. Ezeket a mérési eredményeket használtam fel további értékelésre, így többek között a nanorészecskéket nem tartalmazó kontrollokhoz képesti gátlási százalékok és hatásos koncentrációk meghatározására.

A vizsgálatok során nyert adatokat statisztikai analízisnek vettem alá annak érdekében, hogy meghatározzam a szignifikáns mértékű hatásokat. Ehhez a StatSoft® Statistica 13.1 (TIBCO Software, Inc., Palo Alto, CA, USA) szoftvert használtam és  $p < 0.05$  szignifikancia szintet alkalmaztam. A szignifikáns eltérések meghatározására Fisher-féle LSD (Least Significance Difference) tesztet hajtottam végre egyutas varianciaanalízis (one-way ANOVA) vagy ismételt méréses varianciaanalízis (Repeated Measures, RMANOVA) során.

Egyutas ANOVA-t abban az esetben alkalmaztam, ha a mért végpontot csak egy alkalommal mértem. A próba feltételét, az adatok homogenitását Cochran-féle C-próbával igazoltam.

Ismételt méréses ANOVA-t (RMANOVA) akkor használtam, ha az adott végpontot több időpontban is mértem. A próba feltételének teljesülését Mauchly-féle szfericitás vizsgálattal határoztam meg. A szignifikáns eltéréseket eltérő betűk jelzik a diagramokon.

## **5. Eredmények és értékelésük**

Doktori kutatásom a környezeti kockázatmenedzsment két eltérő, de egymáshoz kapcsolódó irányvonala a környezeti kockázatelemzés, illetve környezeti kockázatsökkentés köré épült, különböző nanoanyagokkal a fókuszban.

### **5.1. Nanorészecskék környezetre gyakorolt hatásának jellemzése környezettoxikológiai megközelítéssel**

A vizsgált GO nanoszuszpenziók fizikai-kémiai tulajdonságaiban csak kis eltérés volt, így több esetben (pl. bakteriális tesztrendszerekben) csupán kis mértékű eltérés volt tapasztalható a két nGO toxicitásában.

Ugyanakkor néhány tesztorganizmus esetén (pl. *Tetrahymena pyriformis* és *Panagrellus redivivus*) jelentős eltérés mutatkozott a toxicitásban és a nanorészecskék viselkedésében.

A komplex ökotoxikológiai felmérés eredményei egyértelműen felhívják a figyelmet arra, hogy különböző trófikus szintekről származó tesztorganizmusok alkalmazása javasolt a hatásvizsgálatra. Eredményeink alapján a toxicitás mértéke nőtt az expozíciós idő előrehaladtával, ami jelzi, hogy a nGO átalakulása fokozhatja a vizsgált tesztorganizmusokra gyakorolt káros hatásukat.

A koncentráció-válasz összefüggés alapján meghatározott 20%-os gátlást okozó EC<sub>20</sub> értékek (1. táblázat) alapján a tesztrendszerek, illetve végpontok érzékenysége az alábbi volt:

*Sinapis alba* szárhossz < *Triticum aestivum* gyökérhossz < *Triticum aestivum* szárhossz < *Sinapis alba* gyökérhossz < *Panagrellus redivivus* mortalitás < *Aliivibrio fischeri* enzimaktivitás < *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia intenzitás < *Escherichia coli* enzimaktivitás < *Tetrahymena pyriformis* enzimaktivitás < *Tetrahymena pyriformis* szaporodás.

**1. táblázat** – A vizsgált nGO szuszpenziók tesztorganizmusokra gyakorolt hatásának EC<sub>20</sub> értékei [mg/L] A piros (és árnyalatai) a kicsi, míg a zöld (és árnyalatai) jelzi a nagy EC<sub>20</sub> koncentráció értékeket.

Tesztrendszer vizsgálati végpontja	Inkubációs idő	AF 96/97	PM 995
		EC <sub>20</sub> [mg/L]	EC <sub>20</sub> [mg/L]
<i>Escherichia coli</i> enzimaktivitás	24 h	3,97	2,57
<i>Aliivibrio fischeri</i> biolumineszcencia intenzitás	30 perc	5,86	5,06
	120 perc	4,01	4,40
<i>Aliivibrio fischeri</i> enzimaktivitás	120 perc	22,86	16,13
<i>Tetrahymena pyriformis</i> szaporodás	24 h	0,008	0,033
	48 h	0,011	0,004
<i>Tetrahymena pyriformis</i> enzimaktivitás	24 h	0,038	0,020
	48 h	0,014	0,004
<i>Panagrellus redivivus</i> mortalitás	24 h	79,74	217,56
	72 h	56,09	11,33
<i>Sinapis alba</i> gyökérhossz	72 h	76,71	40,73
<i>Sinapis alba</i> szárhossz	72 h	380,13	554,01
<i>Triticum aestivum</i> gyökérhossz	72 h	224,78	392,53
<i>Triticum aestivum</i> szárhossz	72 h	223,98	203,49

A legkisebb hatásos koncentráció (SC) értékeket, valamint biztonsági értékelési tényezőként (AF) 1000-et alkalmazva a PNEC<sub>AF 96/97</sub> értékét 8 ng/L-nek, míg a PNEC<sub>PM 995</sub> értékét 4 ng/L-nek állapítottam meg az EU által ajánlott metodikát alkalmazva<sup>20</sup>.

A potenciális környezeti kockázatot (RQ) számszerűsíthetjük, mely a PEC és a PNEC értékének hányadosa. A PEC értékének meghatározására irodalmi adatokat vettem alapul. A *worst-case scenario* megközelítést alkalmazva a legnagyobb lehetséges koncentrációértéket (1,82 ng/L)<sup>21</sup> használtam a számítások során.

Ennek következtében az RQ értéke nGO AF 96/97 típus esetén 0,23; míg nGO PM 995 esetén 0,46 lett. Mivel mindkét érték kisebb egynél, ezért elmondható, hogy a vizsgált nGO típusok (AF 96/97 és PM 995) a konzervatív megközelítésű környezeti kockázatértékelést, vagyis legrosszabb kimenetet (*worst-case scenario*) alkalmazva sem jelentenek környezeti kockázatot.

Kutatásom során megállapításra került, hogy a GO nanorészecskék hatással vannak a nyíltvízi mikrobiális közösség metabolikus aktivitására és diverzitására, ugyanakkor a hatást jelentősen befolyásolja az alkalmazott nGO típusa és koncentrációja. Vizsgálataim során a nGO már kis koncentrációban serkentette a mikrobiális aktivitást, ugyanis 0,16 mg/L szignifikáns hatást gyakorolt a vizsgált végpontokra. Eredményeim alapján a nGO fokozta a mikrobiális aktivitást és a funkcionális diverzitást, mely hatás koncentrációfüggő volt. Kisebb koncentrációt (0,16 – 0,8 mg/L) alkalmazva negatív hatást észleltünk az AWCD és Shannon-indexre vonatkozólag PM 995 esetén, továbbá a Gini-index is káros hatást jelzett mindkét típusú nGO esetén.

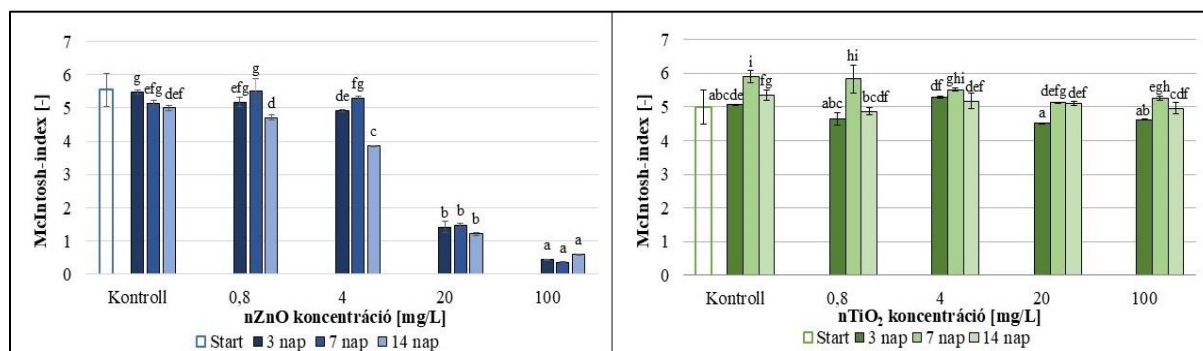
<sup>20</sup> Európai Bizottság (2003) Technical Guidance Document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/9aebb292-39c5-4b9c-b4cb-97fb02d9bea2/language-en>

<sup>21</sup> Zhao, J., Lin, M., Wang, Z., Cao, X., Xing, B. (2021) Engineered nanomaterials in the environment: Are they safe? *Crit Rev Environ Sci Technol* 51:1443–1478. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1764279>

Ugyanakkor a szubsztrátszám és a McIntosh-index értékek ezen GO nanorészecskék kedvező hatását mutatták már kis koncentrációban is. Az SAWCD értékek alapján nem volt szignifikáns eltérés az egyes szubsztrátcsoportok hasznosítási arányában a kezelések által.

A TiO<sub>2</sub> és ZnO nanorészecskék hatásvizsgálata során kimutattam, hogy a tesztelt nanorészecskék koncentrációjától és expozíciós időtől függően szignifikáns káros hatást gyakorolhatnak a mikrobiális aktivitásra. A nZnO jelentősebb hatást fejtett ki a nTiO<sub>2</sub>-hoz képest minden vizsgált végpont esetén. A vizsgálatok során alkalmazott Biolog EcoPlate™ eredményei megerősítették, hogy a fém-oxid nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatása jelentős mértékben függ a részecske típusától. A legtöbb vizsgált végpont esetén szignifikáns csökkenés volt tapasztalható minden alkalmazott koncentráció esetén, néhány esetben már 0,8 mg/L dózisonál is. A legtöbb esetben azonban a legkisebb alkalmazott koncentráció (0,8 mg/L) nem okozott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest.

A McIntosh-index (U) bizonyult a legérzékenyebb diverzitás indexnek a nZnO mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérése során. Az U értéke csökkent az alkalmazott nZnO koncentráció növekedésével, illetve az expozíciós idő előrehaladtával (1. ábra). 20 mg/L nZnO koncentráció alkalmazása 74–76%, míg 100 mg/L nZnO dózis 90–92%-os McIntosh-index csökkenést eredményezett a kontrollhoz képest. A statisztikai analízis (RMANOVA) egyértelmű, szignifikáns hatást (p=0,000) mutatott ki a kezelés, a kontaktidő, illetve ezek kölcsönhatása esetén.



**1. ábra:** Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása a McIntosh-indexre (U). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Az irodalmi adatok alapján a nZnO becsült környezeti koncentrációja felszíni vizekben 0,38 µg/L, míg a nTiO<sub>2</sub>-é 2,17 µg/L<sup>22</sup>, így a jelenlegi információk alapján a nZnO és nTiO<sub>2</sub> felszíni vizek mikrobiális közösségére nem gyakorolnak jelentős hatást a környezetben előforduló koncentrációban. A nZnO és nTiO<sub>2</sub> kezelések, illetve az expozíciós idő hatását a Biolog EcoPlate™ segítségével vizsgált végpontok alapján elmondható, hogy az egyes végpontok érzékenysége eltérő, illetve a Biolog EcoPlate™ alkalmas módszer lehet a nanorészecskék mikrobiális közösségre gyakorolt hatásának felmérése.

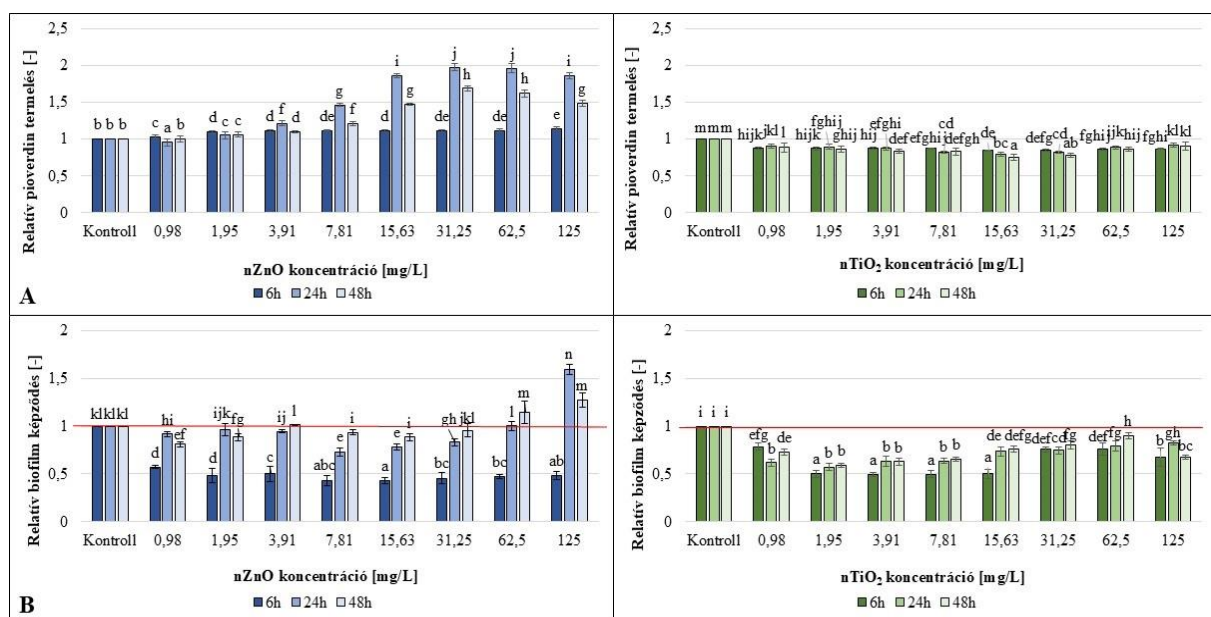
### 5.1.1. Fém-oxid nanorészecskék mikrobiális kommunikációra gyakorolt hatása

A *P. aeruginosa* pioverdin termelése és biofilmképzése QS-szabályozott folyamat, melyekre jelentős hatást gyakorolnak a nanorészecskék (2. ábra). Eredményeim alapján a nZnO-nak koncentráció-függő pozitív hatása van a pioverdin termelésre.

<sup>22</sup> Sun, T.Y., Bornhöft, N.A., Hungerbühler, K., Nowack, B. (2016) Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Sci Technol* 50:4701–4711. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05828>

Az 1,95–125 mg/l koncentrációjú kezelések pozitív hatást gyakoroltak erre a végpontra, egyedül 0,98 mg/L nZnO koncentrációnál tapasztaltunk enyhe gátló hatást 24 óra elteltével. A legnagyobb pioverdin termelés növekedést 24 óra kontaktidő után mértük (2.A. ábra). A nTiO<sub>2</sub> pioverdin termelésre gyakorolt hatása eltérőnek bizonyult a nZnO-hoz képest, ugyanis minden alkalmazott nTiO<sub>2</sub> dózis szignifikáns mértékben gátolta a sziderofór képzést, noha a hatás mértéke hasonló volt az összes kezelésnél (2.A. ábra).

Vizsgálataim szerint mind a ZnO nanorészecskék koncentrációja, mind pedig az expozíciós idő hossza jelentősen befolyásolja a *P. aeruginosa* biofilm képzésre gyakorolt hatását, ugyanis jelentős biofilmképzés csökkenés volt tapasztalható 6 óra inkubációs idő után, míg 24 és 48 óra elteltével a gátló hatás mértéke csökkent (2.B. ábra). Ezzel szemben a nTiO<sub>2</sub> biofilmképzésre gyakorolt hatása hasonló a pioverdin termelésnél tapasztaltakkal, ugyanis minden kezelés esetén szignifikáns gátló hatást figyeltem meg, ám enyhén csökkent az inhibíció mértéke a nTiO<sub>2</sub> koncentráció és a kontaktidő növelésével (2.B. ábra).



2. ábra: Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium pioverdin termelésére (A rész) és biofilm képzésére (B rész). A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

Fontos megállapítás, hogy eredményeim alapján, adott nanorészecske típus eltérő módon befolyásolhatja a különböző, bakteriális kommunikáció által vezérelt folyamatokat, így a biofilmképzést és a sziderofór termelést.

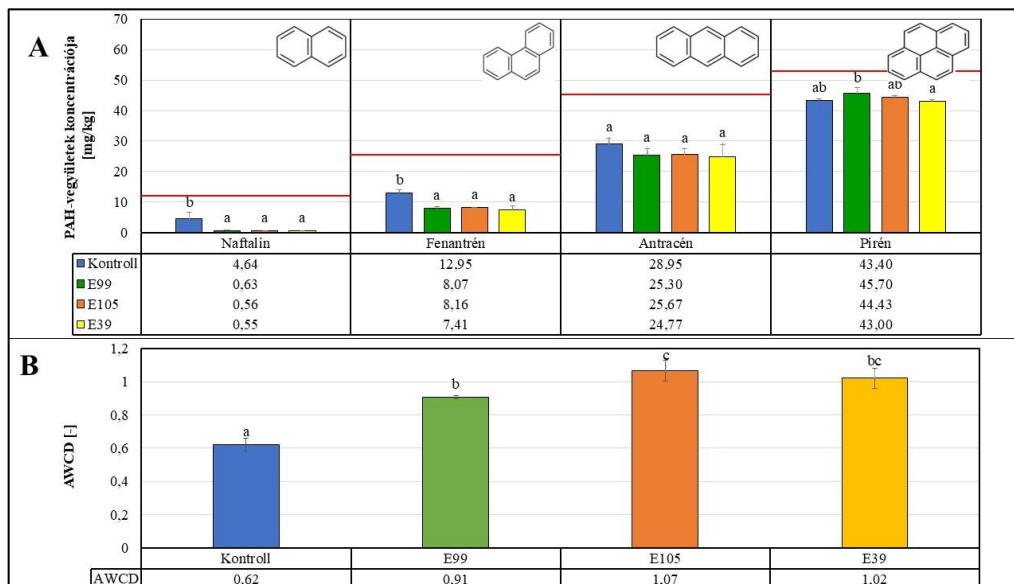
Mindemellett a nZnO biofilmképzésre gyakorolt hatása függ az alkalmazott koncentrációtól és expozíciós időtől, melyektől függően serkentő és gátló hatása egyaránt megfigyelhető. Ezzel szemben a nTiO<sub>2</sub> minden kísérleti beállítás mellett egyértelműen gátolta a biofilmképzést és pioverdin termelést egyaránt.

## **5.2. Enzim-alapú technológiafejlesztés policiklusos aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajok bioremediációjára**

A PAH vegyületekkel szennyezett talajok új enzim-alapú bioremediációs eljárásának fejlesztéséhez kapcsolódó kutatásaim során az újonnan létrehozott enzimek hozzáadása nélkül

is jelentős PAH eltávolítást tapasztaltunk, ami a talajban lévő természetes mikroflóra PAH-bontó képességére és aktivitására utal (3.A. ábra).

Az új kataláz-peroxidáz és gentizát 1,2-dioxigenáz enzimek (E39, illetve E99 és E105) hozzáadása a talajhoz a naftalin és a fenantrén degradációjának intenzitását jelentősen növelte, azonban az antracén és a pirén eltávolítását az enzimek hozzáadása nem fokozta.



3. ábra: PAH-vegyületek koncentrációja (A rész) és mikrobiológiai aktivitás (B rész) az új enzimekkel kezelt talajokban. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

A talaj természetes mikrobiális aktivitásának hatását a Biolog EcoPlate™ teszt eredményei (3.B. ábra) is tükrözték. Az enzimek hozzáadását követően meghatározott AWCD értékek szignifikáns mértékű növekedése arra utal, hogy az enzimek pozitív hatással lehetnek a talajban lévő mikrobákra.

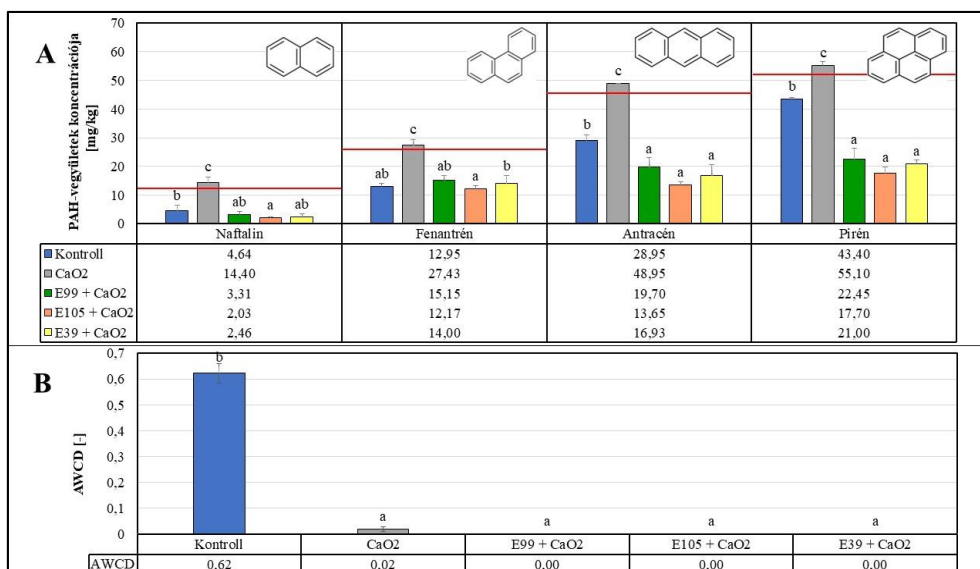
Mikrokozmosz kísérletünk alapján az új enzimek jelentős degradációs aktivitását állapítottuk meg néhány, de nem minden vizsgált PAH-vegyületre vonatkozólag (3.A. ábra).

További kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy az enzimek hozzáadása egy szervesen oxidáló adalékkal, kalcium-peroxiddal ( $\text{CaO}_2$ ) kombinálva növeli-e a PAH-degradációra gyakorolt kedvező hatást (4.A. ábra). A  $\text{CaO}_2$  hozzáadása által a PAH vegyületek koncentrációja nem csökkent a kiindulási koncentrációhoz képest (4.A. ábra), melynek oka valószínűsíthetően az, hogy a  $\text{CaO}_2$  egyértelműen gátolta a talaj természetes mikroflórájának aktivitását, mivel a – kontroll talajnál is tapasztalt – metabolikus aktivitás a  $\text{CaO}_2$  hozzáadására teljesen megszűnt (4.B. ábra).

Ugyanakkor vizsgálataink szerint a  $\text{CaO}_2$  és az enzimek együttes alkalmazása növelte a nehezebben bontható PAH-vegyületek, így az antracén és a pirén degradációját (4.A. ábra). Az antracén koncentrációja megközelítőleg 57–70%-kal, míg a pirén koncentrációja körülbelül 56–66%-kal csökkent az enzimek és a  $\text{CaO}_2$  kombinált használata esetén. Ez az eredmény arra utal, hogy az alkalmazott enzimek hatékonyan képesek degradálni a PAH szennyezőanyagokat mikrobiális aktivitás hiányában is.

Az alkalmazott enzimek növelték a remediáció hatékonyságát, míg a  $\text{CaO}_2$  jelenlétében csökkent a szennyezőanyag eltávolítási hatékonyság a kisebb molekulatömegű PAH-vegyületek esetén (enzimek jelenlétében). Figyelemre méltó, hogy naftalin esetén az enzim kezelések során az eltávolítási hatékonyság körülbelül 95% volt  $\text{CaO}_2$  nélkül, míg az enzimek és a  $\text{CaO}_2$  kombinált alkalmazásával ez 73–83%-ra csökkent.

Hasonló eredményre jutottunk fenantrén esetén is, ahol az enzimek hozzáadásával a degradáció hatékonysága 68–71% volt, míg az enzimek és a CaO<sub>2</sub> együttes alkalmazásával 41–53%-ra csökkent.



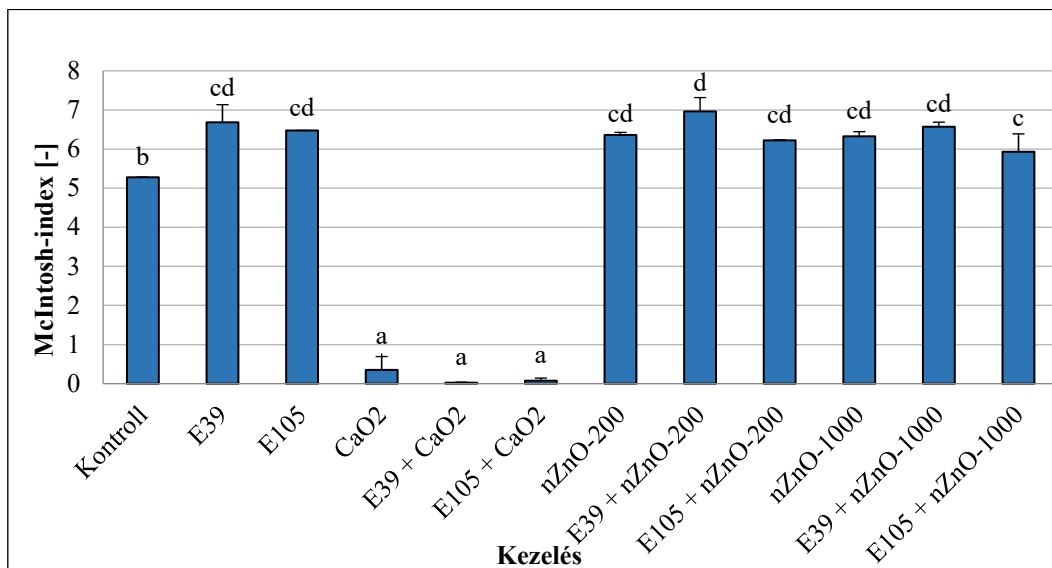
**4. ábra:** PAH-vegyületek koncentrációja (A rész) és mikrobiológiai aktivitás (B rész) a CaO<sub>2</sub>-dal és/vagy új enzimekkel kezelt talajokban. A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ). A piros vonal a kezdeti értéket szemlélteti.

Összegzésként elmondható, hogy az alkalmazott új enzimek hatékonyan bontották a szennyezőanyagokat, melyek közül az E105 enzim hatékonysága kiemelendő, mivel az általa elért pirén eltávolítás szignifikánsan nagyobb volt az E99 és E39 enzimeknél tapasztalható képest. A CaO<sub>2</sub> és az enzimek együttes alkalmazása kisebb mértékű eltávolítást eredményezett naftalin és fenantrén esetén a csak enzimikus kezelésekhez képest, miközben nagyobb hatékonyságot értünk el az együttes alkalmazásukkal az antracén és a pirén eltávolításában. A CaO<sub>2</sub> önmagában nem bizonyult hatékonynak a szennyezőanyagok eltávolításában. Míg jelentős káros hatást gyakorolt a talajban található természetes mikrobiális aktivitásra, az enzimikus lebontás – így a PAH-vegyületek eltávolítása – szignifikáns mértékben növekedett a CaO<sub>2</sub> kezeléssel kombinálva.

Mindemellett fontos megemlíteni, hogy kutatásunk bizonyította, a Biolog EcoPlate™ alkalmas a PAH-vegyületekkel szennyezett talajok remediációja során a mikrobiális közösség aktivitásának jellemzésére, sőt szükséges kiegészítő módszer a szennyezőanyagok koncentrációjára vonatkozó analitikai eredmények mellett a bioremediáció hatékonyságának tágabb értelmezéséhez.

További vizsgálataimat a legnagyobb mikrobiális aktivitást, illetve szennyezőanyag eltávolítást eredményező E105 (gentizát 1,2-dioxigenáz) és E39 (kataláz-peroxidáz) enzimekkel folytattam, és felmértem, hogy 200, illetve 1000 mg/kg nZnO hogyan befolyásolja a remediáció hatékonyságát.

A Biolog EcoPlate™ technikával végzett monitoring vizsgálat alapján, a McIntosh-index értékeit (5. ábra) – az AWCD-hez hasonló mintázat szerint – mindkét enzimikus kezelés szignifikáns mértékben növelte, míg a CaO<sub>2</sub> kezelés szignifikánsan csökkentette, továbbá a nZnO hozzáadásával is növekedett a mikrobiális aktivitást jelző mérőszám.

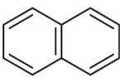
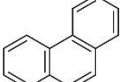
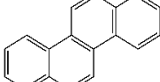



5. ábra: Különböző kezelések hatása a McIntosh-indexre (U).

A különböző betűk az egymástól való szignifikáns eltéréseket jelzik ( $p < 0.05$ ).

A különböző szennyezőanyagok kiindulási koncentrációjához képesti eltávolítási hatékonyságot szemlélteti a 2. táblázat.

2. táblázat – A különböző kezelések átlagos szennyezőanyag-eltávolítási hatékonysága a kezdeti szennyezőanyag koncentrációkhoz képest GC-MS mérések alapján. Minden oszlopban a piros (és árnyalatai) jelzi a kicsi, míg a zöld és árnyalatai a jelentős hatékonyságú kezeléseket.

Kezelés	Eltávolítás mértéke [%] (átlag ± szórás)				
	Naftalin	Fenantrén	Krizén	Pirén	Összes PAH
					
Kontroll	51,7 ± 5,1	29,5 ± 0,9	59,1 ± 6,4	16,7 ± 6,9	26,6 ± 3,1
E39	59,4 ± 1,9	37,2 ± 2,0	54,6 ± 9,1	10,3 ± 0,5	28,6 ± 1,2
E105	42,5 ± 0,4	29,7 ± 1,7	63,6 ± 0,0	2,1 ± 0,5	19,9 ± 1,0
CaO <sub>2</sub>	28,3 ± 18,0	6,9 ± 0,6	60,6 ± 5,3	10,8 ± 8,0	11,2 ± 2,0
E39 + CaO <sub>2</sub>	42,9 ± 5,2	20,9 ± 0,3	72,7 ± 0,0	22,6 ± 0,0	22,9 ± 1,7
E105 + CaO <sub>2</sub>	47,0 ± 12,4	17,3 ± 2,6	63,6 ± 0,0	19,5 ± 6,3	23,2 ± 3,5
nZnO-200	80,8 ± 1,8	29,1 ± 8,2	63,6 ± 0,0	19,2 ± 3,9	24,5 ± 9,4
E39 + nZnO-200	91,4 ± 0,9	43,7 ± 1,4	69,7 ± 5,3	15,2 ± 0,2	35,5 ± 1,2
E105 + nZnO-200	93,5 ± 0,4	47,0 ± 2,0	69,7 ± 5,3	21,6 ± 3,9	39,2 ± 3,5
nZnO-1000	84,7 ± 0,8	34,3 ± 2,0	60,6 ± 5,3	11,8 ± 5,6	29,1 ± 4,7
E39 + nZnO-1000	92,4 ± 0,2	32,7 ± 2,6	63,6 ± 0,0	11,1 ± 0,2	29,4 ± 3,2
E105 + nZnO-1000	96,4 ± 1,5	38,2 ± 0,6	69,7 ± 5,3	20,7 ± 5,6	37,2 ± 0,1

Eredményeink alapján a CaO<sub>2</sub> – a kontrollal összehasonlítva – ebben az esetben is jelentős mértékben gátolta a szennyezőanyagok degradációját, ami jelzi a mikrobiális aktivitásra gyakorolt gátló hatását.

A nZnO a legtöbb esetben növelte a degradáció mértékét a kontrollhoz képest, mind 200, mind 1000 mg/kg koncentrációban alkalmazva. Enzimekkel történő kombinált használata szintén serkentőleg hatott a szennyezőanyagok eltávolítására, kivéve a pirénnél E39 enzimmel kombinált kezelés esetén.

Bár a nZnO és az enzimek kombinált alkalmazása a tesztelt PAH vegyületek hatékony lebontását eredményezi, és az E105 enzim 1000 mg/kg nZnO-dal történő együttes alkalmazása nagyobb naftalin eltávolítási hatékonyságot eredményezett, mint 200 mg/kg nZnO-dal való kombinált használata során, eredményeink alapján a legnagyobb eltávolítási hatékonyságot az E105 enzim és 200 mg/kg nZnO szimultán alkalmazásával érték el a tesztrendszerben.

Összegzésként, kutatásunk eredményei alapján a nehezen bontható PAH szennyezőanyagok legnagyobb lebontási arányának elérésére a leghatékonyabb módszer az E105 enzim és 200 mg/kg nZnO együttes alkalmazása kőzetliszt (aleurit) közegben.

Ugyanakkor megemlítendő, hogy az E105 enzim és 1000 mg/kg nZnO, valamint az E39 enzim és 200 mg/kg nZnO kombinációja szintén jelentős szennyezőanyag eltávolítást eredményezett, ami azt jelzi, hogy ezek az kezelések is rendkívül hatékonyak lehetnek bizonyos PAH-vegyületek eltávolításában. Ennek következtében az E39 (kataláz-peroxidáz), E105 (gentizát 1,2 dioxigenáz) enzimek és 200 mg/kg nZnO kombinált alkalmazása javasolt a szennyezett talajokból származó PAH szennyezőanyagok eltávolítására. Ezen, új enzimekkel végzett bioremediáció hatékony lehetőség lehet tápanyagban szegény, alacsony biológiai aktivitású szennyezett talajok esetén PAH-vegyületek eltávolítására, azonban további vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy átfogó képet kapjunk a nZnO környezetre, illetve több trófikus szinten lévő élőlényekre gyakorolt hatásairól, valamint a PAH szennyezők degradációját elősegítő, szűkebb nZnO koncentrációtartomány meghatározásához.

## 6. Tézisek

1. Grafén-oxid nanoanyagok esetén elsőként végeztem környezeti kockázatelemzést édesvízi ökoszisztémára. A nano grafén-oxidok (nGO) környezeti kockázatelemzése során kimutattam, hogy a *Tetrahymena pyriformis* tesztorganizmus szaporodásgátlásának vizsgálata kiemelkedően érzékeny módszer, és akár korai figyelmeztető rendszerként is alkalmazható grafén-oxid típusú szennyezőanyagok hatásfelmérésében. (2.)
  - a. A PM 995 nGO esetén már 4 µg/L koncentráció esetén szignifikáns gátló hatást mutattam ki a táplálékhálózatban és az elemkörforgalmakban fontos szerepet betöltő protozoa organizmuson.
  - b. A szakirodalomban a grafén-oxid nanorészecskék hatását a *Tetrahymena pyriformis* tesztorganizmuson elsőként vizsgáltam.
2. A nano grafén-oxidok (nGO) komplex környezettoxicológiai kockázatelemzése és a grafén-oxidok környezeti koncentrációjára vonatkozó ismereteink alapján kimutattam, hogy a tesztelt nGO származékok (AF 96/97 és PM 995) nem jelentenek környezeti kockázatot az édesvízi ökoszisztémára.

A széles-spektrumú hatásfelmérés érdekében kidolgoztam egy módszeregyüttest, aminek alkalmazásával különböző trófikus szintekről származó tesztorganizmusok eltérő végpontjainak vizsgálata alapján értékelhető a nano grafén-oxidok környezeti kockázata. (2.)
3. A Biolog EcoPlate™ rendszerrel kapott kísérleti adatok átfogó elemzésével kimutattam, hogy a metabolikus aktivitás és funkcionális diverzitás indexek együttes alkalmazása javasolt a mikrobiális közösségek ökológiai vizsgálataikhoz nanoanyagok hatásfelmérése során. A McIntosh-index, mint érzékeny és reprezentatív diverzitásmutató meghatározása javasolt a Biolog EcoPlate™ általánosan alkalmazott végpontjainak kiegészítéseként. (1.)
4. Enzim-alapú bioremediációs technológiafejlesztés során kimutattam, hogy 20 mM kalcium-peroxid (CaO<sub>2</sub>) oxidálószer hozzáadása a technológia monitoring és hatékonyságvizsgálat szempontjából is előnyös.

A  $\text{CaO}_2$  hatására a talaj természetes mikroflórájának aktivitása megszűnt, így a mikrobiális befolyásoló hatás nélkül a különböző enzimek degradációs hatékonysága jól vizsgálható és leírható az adott környezeti elemben. A 20 mM  $\text{CaO}_2$  és a metagenomikai úton kifejlesztett enzimek jelenlétében az antracén- és pirén koncentrációja szignifikánsan csökkent a kontroll kezelésekhez képest, ami arra utal, hogy az új, kataláz-peroxidáz, gentizát 1,2-dioxigenáz enzimek képesek ezen nehezen bontható PAH vegyületek hatékony lebontására. (3.)

5. Kimutattam, hogy a policiklusos aromás szénhidrogének eltávolítására fejlesztett innovatív enzim-alapú bioremediációs technológia hatékonysága növelhető kis mikrobiológiai aktivitású, kedvezőtlen mechanikai összetételű talajban enzimek (kataláz-peroxidáz, gentizát 1,2-dioxigenáz) és 200 mg/kg nZnO együttes alkalmazásával, főként naftalin és a nehezebben bontható fenantrén és krizén esetén közepes szennyezettségű közegben, potenciális káros hatások észlelése nélkül. (4.)

## 7. Következtetések és alkalmazási lehetőségek

A kutatásaim során elvégzett komplex kísérletek eredményei támpontot nyújthatnak a nanotechnológiai termékek felelős használatához, valamint a környezetvédelmi politikák és szabályozások kialakításához, melyek a nanotechnológia fejlődésének fenntartható irányát hivatottak elősegíteni, ugyanis a nanorészecskék és az élővilág kölcsönhatásainak megértése elengedhetetlen a környezeti fenntarthatóság és az emberi egészség védelme szempontjából.

A grafén-oxid nanorészecskék (nGO) toxicitásának vizsgálata során a *Tetrahymena pyriformis* protozoa szaporodásgátlása bizonyult a legérzékenyebb tesztrendszernek, melynél már 0,004 mg/L koncentráció esetén is szignifikáns gátló hatást kaptunk, így kutatási eredményeink alátámasztják a *Tetrahymena pyriformis* alkalmazásának jelentőségét és szükségességét ökotoxikológiai kutatásokban és vizsgálati metodikákban. Mindemelllett, a *worst-case* scenáriót alkalmazó kockázatértékelés során arra a megállapításra jutottunk, hogy a vizsgált GO nanorészecskék nem jelentenek környezeti kockázatot. Ezt alátámasztotta a Biolog EcoPlate™ alkalmazásával kivitelezett vízi mikrobiális közösségre gyakorolt hatás felmérése, melynek során koncentrációfüggő mikrobiális aktivitás növekedést tapasztaltunk a vizsgált 0,8–100 mg/L koncentrációtartományban.

Édesvízből származó mikroflóra metabolikus aktivitására és funkcionális diverzítására gyakorolt hatás felméréséből származó eredmények alapján a nZnO jelentősebb gátló hatást gyakorol a mikroflóra a nTiO<sub>2</sub>-hoz képest, de a hatást befolyásolja az alkalmazott nanorészecske koncentrációja és az expozíciós idő.

A Biolog EcoPlate™ használatával már a nZnO kis koncentrációja esetén (0,8 mg/L) is szignifikáns hatásokat mutattunk ki; emellett különböző vizsgálati végpontokat határoztunk meg a tesztrendszerben, melyek eltérő érzékenységet mutattak. Eredményeink alapján a McIntosh-index bizonyult az egyik legérzékenyebb és a mikrobiális aktivitás és funkcionális diverzitás változását leginkább reprezentáló mérőszámunk, így javasoljuk ennek használatát a későbbiekben. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a többi végpont együttes vizsgálata célszerű, mivel eltérő, sokszor kiegészítő információt hordoznak magukban. Mindezek alapján elmondható, hogy a Biolog EcoPlate™ technika jól alkalmazható a nanorészecskék vízi mikrobaközösségekre gyakorolt hatásának felmérésére.

A vizsgált nanorészecskék jelentős potenciállal rendelkeznek a bakteriális kommunikáció által vezérelt folyamatok befolyásolására, melynek előnye számos területen kiaknázható (pl. biofilmpépzés általi megbetegedések elkerülése, szennyvíztisztítás, pigmenttermelés alapján festékanyagok gyártása), de az alkalmazási paraméterek meghatározása további kutatást igényel.

Eredményeink alapján policiklusos aromás szénhidrogénekkal (PAH) szennyezett talajok remediációjára jól alkalmazhatók a metagenomikai módszerekkel tervezett kataláz-peroxidáz és gentizát 1,2-dioxigenáz enzimek. Ezen enzimek hatékonyságának vizsgálata során kapott eredmények alapján, a kalcium-peroxiddal (CaO<sub>2</sub>) kombinált kezelés jó módszer lehet különböző enzimek aktivitásának kimutatására.

A nZnO és enzim kombinált kezeléseket eredményei azt is szemléltették, hogy 200 mg/kg nZnO alkalmazása kedvező lehet PAH szennyezett talajok kármentesítése során, amely új nano-bioremediációs eljárások kidolgozásának alapjául szolgálhat.

Összességében elmondható, hogy kutatásom során a nanorészecskék toxikus hatásának felmérése és jellemzése mellett azok kedvező hatásait is vizsgáltam további alkalmazási területek megalapozása céljából.

## 8. Közlemények

### 8.1. Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk

Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények (impakt faktor, kvartilis, független hivatkozás)

1. **Németh, I.**, Molnár, S., Vaszita, E., Molnár, M. (2021). The Biolog EcoPlate™ technique for assessing the effect of metal oxide nanoparticles on freshwater microbial communities. *Nanomaterials*, 11(7), 1777. <https://doi.org/10.3390/nano11071777> IF: 5,719; Q1; FI: 50
2. **Németh, I.**, László, K., Bulátkó, A., Vaszita, E., Molnár, M. (2023). Ecotoxicity assessment of graphene oxides using test organisms from three hierarchical trophic levels to evaluate their potential environmental risk. *Nanomaterials*, 13(21), 2858. <https://doi.org/10.3390/nano13212858> IF: 4,4; Q1; FI: 2
3. Nagy, K. K., Takács, K., **Németh, I.**, Varga, B., Grolmusz, V., Molnár, M., Vértessy, G. B. (2024). Novel enzymes for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons identified by metagenomics and functional analysis in short-term soil microcosm experiments. *Scientific Reports*, 14, 11608. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61566-6> IF: 3,9; D1; FI: 10
4. **Németh, I.**, Vaszita, E., Molnár, M. (2025). Influence of nZnO on enzyme-mediated PAH-removal from contaminated soil. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, <https://doi.org/10.3311/PPch.41649> IF: 1,8; Q3.

Bírálat alatt lévő kéziratok

5. **Németh, I.**, Vaszita, E., Molnár, M. (2025). Nanoparticle-induced modulation of biofilm formation and pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa*: A comparative study of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Environmental Toxicology*, IF: 3,9; Q1. (bírálat alatt)
6. Law, C.Y.K., Wang, X., Molnár, M., Folens, K., Peñacoba-Antona, L., **Németh, I.**, De Vrieze, J., Rabaey, K., Esteve-Núñez, A., De Gussemme, B., Hofmann, R., Boon, N. (2025). Removal of fluorinated micropollutants with biogenic nanoparticles in a continuously operated membrane reactor. *Biotechnology Reports*, IF: 3,4; Q1. (bírálat alatt, *major revision* folyamatban)

Lektorált konferenciakiadványok

7. **Németh, I.**, Szikszai, S., Molnár, M. (2022). Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása *Pseudomonas aeruginosa* baktérium életjelenségeire. *XXIII. Nemzetközi Tudományos PhD-Konferencia elektronikus könyve*, Professzorok az Európai Magyarországiért Egyesület, Budapest. ISBN 978-615-5709-16-6

## Nem lektorált, ismeretterjesztő folyóiratban megjelent közlemények

8. Fekete-Kertész, I., Nagyné, L. K., **Németh, I.**, Molnár, M. (2022). Bolhából elefántot? - Nanorészecskék környezettoxicológiája. *Élet és Tudomány*, 77(26), 850–852.

## Konferencia részvételek szóbeli és/vagy poszter előadással

### Szóbeli előadások:

9. **Németh, I.**, Szikszai, S., Molnár, M. (2022). Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása *Pseudomonas aeruginosa* baktérium életjelenségeire. *XXIII. Nemzetközi Tudományos PhD-Konferencia, Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület*, Budapest. 2022.04.28.
10. **Németh, I.**, Bodó, F., Szikszai, S., Molnár, M. (2020). Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* biofilm formation. *4th National Conference of Young Biotechnologists*, Debrecen, Hungary. 2020.12.19.
11. **Németh, I.** (2022). Nanorészecskék hatásának felmérése a környezetre és bioremediációs eljárások hatékonyságára. *5. ABÉT Tanszéki Doktoráns Konferencia*, Budapest. 2022.01.31.
12. **Németh, I.**, Molnár, M. (2022). Nanorészecskék ökotoxikológiai vizsgálata eltérő tesztrendszerekkel. *XXV. Tavasz Szél Konferencia*, Pécs. 2022.05.06.

### Poszter prezentációk:

13. **Németh, I.**, Szikszai, S., Molnár, M. (2022). Cink-oxid és titán-dioxid nanorészecskék hatása *Pseudomonas aeruginosa* baktérium életjelenségeire. *XXIII. Nemzetközi Tudományos PhD-Konferencia, Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület*, Budapest. 2022.04.28.
14. **Németh, I.**, Bodó, F., Szikszai, S., Molnár, M. (2020). Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* biofilm formation. *4th National Conference of Young Biotechnologists*, Debrecen, Hungary. 2020.12.19.

## **8.2. Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk**

### Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények (impakt faktor, kvartilis, független hivatkozás)

15. Molnár, M., Fenyvesi, E., Berkl, Zs., **Németh, I.**, Fekete-Kertész, I., Márton, R., Vaszita, E., Varga, E., Ujj, D., Sente, L. (2021). Cyclodextrin-mediated quorum quenching in the *Aliivibrio fischeri* bioluminescence model system – Modulation of bacterial communication. *International Journal of Pharmaceutics*, 594, 120150. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120150> IF: 5,720; D1; FI: 28
16. Dell'Armi, E., Zeppilli, M., Di Franca, M. L., Matturro, B., Feigl, V., Molnár, M., Berkl, Zs., **Németh, I.**, Yaqoubi, H., Rossetti, S., Papini, M. P., Majone, M. (2022). Evaluation of a bioelectrochemical reductive/oxidative sequential process for chlorinated aliphatic hydrocarbons (CAHs) removal from a real contaminated groundwater. *Journal of Water Process Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103101> IF: 5,485; Q1; FI: 17

### Lektorált konferenciakiadvány

17. Berkl, Zs., Molnár, M., Fenyvesi, É., **Németh, I.**, Buda, K., Fekete-Kertész, I., Márton, R., Sente, L. (2020). Cyclodextrin-mediated quorum quenching in *Aliivibrio fischeri* model system. *4th National Conference of Young Biotechnologists*, Debrecen, Hungary. 2020.12.19.

## Egyéb konferencia részvételek

### Szóbeli előadás:

18. Berkl, Zs., Molnár, M., Fenyvesi, É., **Németh, I.**, Buda, K., Fekete-Kertész, I., Márton, R., Sente, L. (2020). Cyclodextrin-mediated quorum quenching in *Aliivibrio fischeri* model system. *4th National Conference of Young Biotechnologists*, Debrecen, Hungary. 2020.12.19.

### Poszter prezentáció:

19. Berkl, Zs., Molnár, M., Bordohányi, Á., Fekete-Kertész, I., **Németh, I.**, Fenyvesi, É., Sente, L. (2019). The effect of cyclodextrins on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* – Modulation of quorum sensing. *6th European Conference on Cyclodextrins*. Santiago de Compostela, Spain.
20. Molnár, M., Berkl, Zs., **Németh, I.**, Fekete-Kertész, I., Márton, R., Timár, B., Fenyvesi, É., Sente, L. (2019). Cyclodextrin-mediated quorum quenching in the *Aliivibrio fischeri* bioluminescence model system – modulation of bacterial communication. *6th European Conference on Cyclodextrins*. Santiago de Compostela, Spain.